Darstellung und Anwendung von fluoreszierenden Carbonsäurederivaten

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hans Detlef Meyer
aus Plüderhausen

1978

Darstellung und Anwendung von fluoreszierenden Carbonsäurederivaten

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hans Detlef Meyer

aus Plüderhausen

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 1. August 1978

Dekan:	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Hagenmaier

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Juni 1975 bis April 1978 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer, danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit.

Den Herren Professor Dr. H. Hagenmaier und Priv.-Dozent Dr. H. Schott danke ich für wertvolle Anregungen und Ratschläge.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	PROBLEMSTELLUNG	3
3.	THEORETISCHER TEIL	4
3.1.	Fluoreszenz	4
3.1.1.	Theoretische Grundlagen der Photoluminiszenz	4
3.1.2.	Einflüsse auf die Fluoreszenz	7
	a) Molekülstruktur	7
	b) Lösungsmittel und Temperatur	11
	c) Konzentration	13
3.2.	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	15
3.2.1.	Allgemeine Grundlagen der HPLC	15
3.2.2.	Reversed-Phase-Chromatographie	19
4.	ALLGEMEINER TEIL	23
4.1.	Naphthalinderivate zur Fluoreszenzmarkierung	23
4.1.1.	Bindung der Säurefunktion	23
4.1.2.	Substituenten in Naphthalin	26
4.2.	4-Methyl-7-Methoxy-Cumarin-Ester	29
4.2.1.	Reaktion und Detektion	29
4.2.2.	HPLC der MMC-Ester	31
4.2.3.	Massenspektrometrische Untersuchungen	39
4.2.4.	NMR-Spektren	48

5.	EXPERIMENTELLER TEIL	52
5.1.	Naphthalin-Derivate	52
5.2.	4-Methyl-7-Methoxy-Cumarin-Ester	59
	a) 7-Methoxy-cumarin-4-essigsäure	59
	b) 4-Bromomethyl-7-methoxy-cumarin	59
	c) MMC-Ester	60
	d) Fettsäuren aus natürlichen Fetten	61
5.3.	HPLC	62
6.	GERÄTE UND LÖSUNGSMITTEL	64
7.	DISKUSSION	65
8.	ZUSAMMENFASSUNG	66
9.	LITERATURVERZEICHNIS	67

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Br-MMC	4-Bromomethyl-7-methoxy-cumarin
d	Duplett
Dansyl-	5-N,N-Dimethylamino-naphthalin-sulfonyl-(1)-
DC	Dünnschicht-Chromatographie
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
LC	Flüssigkeitschromatographie
m	Multiplett
MMC	4-Methyl-7-methoxy-cumarin
RP	Reversed Phase
RPC	Reversed-Phase-Chromatographie
s	Singulett

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurden der Trennung und Identifizierung von Carbonsäuren steigende Aufmerksamkeit gewidmet. Insbesondere die Analyse von Fettsäuren zog man verstärkt zur Untersuchung von vielen biologischen Systemen heran (1).

Bei der Trennung von Carbonsäuren hat sich die Überführung der sehr polaren Carboxylfunktion in unpolare Derivate bewährt. Die am häufigsten verwendeten Derivate sind unterschiedliche Ester, deren Eigenschaften auf die angewendete Detektionsmethode abgestimmt wurde (2).

In der Papier- und Dünnschichtchromatographie wurden u.a. auch die orangefarbenen N,N-Dimethyl-p-Aminobenzolazophenacylester für die Trennung von Carbonsäuren eingesetzt (3-5). Bei säulenchromatographischer Trennung von Fettsäuren an Kieselgel fanden die ebenfalls orangen p-Phenylazophenacylester Anwendung (6).

Für die Trennung von Carbonsäuren mittels Gaschromatographie wurden möglichst leichtflüchtige Ester hergestellt. Die Methyl- (7), Benzyl- (8) und Pentafluorobenzylester (9) erfüllten diese Bedingung und wurden daher auch am häufigsten verwendet.

Methylester wurden anfangs auch noch bei Carbonsäuretrennungen mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. Die hierbei angewandte Detektionsmethode mittels Refraktrometrie erwies sich als zu unempfindlich für analytische Trennungen.
Eine erhebliche Verbesserung der Empfindlichkeit bis zu 10^{-10} g konnte durch die Einführung der UV-Absorption als Detektionsmethode erreicht werden. Daher wurden in der HPLC bisher fast ausschließlich UV-absorbierende Carbonsäurederivate verwendet. Benzyl- und p-Nitrobenzylester

wurden durch unterschiedliche Derivatisierungsreaktionen dargestellt und mit verschiedenen Methoden getrennt (11-13). Die am meisten angewandten Carbonsäurederivate in der HPLC sind die Phenacylester. Es wurden sowohl die unsubstituierten (14), als auch die p-Nitro- (15) und p-Bromphenacylester (16) bei Trennungen eingesetzt. Prostaglandine wurden als Nitrophenacylester mittels HPLC getrennt und bis zu 1 ng nachgewiesen (17). Einige biologisch wichtige Dicarbonsäuren, wie Fumar- und Malonsäure, wurden in Form ihrer Bromo- und p-Nitrophenacylester untersucht (18). In Naphthacylester überführte Fettsäuren konnten ebenfalls mittels HPLC getrennt werden.

Durch Fluoreszenz-Markierung, das sogenannte "Fluorescence Labelling", läßt sich mit der Einführung einer fluoreszierenden Gruppe die Nachweisempfindlichkeit noch weiter steigern (2). Insbesondere mit der HPLC lassen sich durch Fluorescence Labelling noch sehr geringe Substanzmengen (weniger als 10^{-15} Mol) nachweisen (20). Von vielen funkionellen Gruppen sind fluoreszierende Derivate bekannt und wurden in der Analytik verwendet. So wurde über HPLC-Trennungen der fluoreszierenden N,N-Dimethylaminonaphthalinsulfonsäurederivate (Dansyl-) von Aminen (21), Substanzen mit Hydroxylgruppen wie Adrenalin, Fungiziden und Alkaloiden (22-24) und Aminosäuren (25) berichtet. Das Fluorescence Labelling von Ketonen und Aldehyden gelingt mit Dansylhydrazin (26).

Durch Einsatz von Polychlorcarbonsäuren als Herbizide im Pflanzenschutz sind deren Trennung und Nachweis, gerade in geringsten Konzentrationen, in Toxikologie und Umweltschutz notwendig geworden (22,28). Erst 1976 sind von Dünges fluoreszierende Carbonsäurederivate beschrieben worden (28). Diese 7-Methoxy-cumarin-4-methylester verschiedener Carbonsäuren wurden von Dünges et.al. dünnschichtchromatographisch getrennt und nachgewiesen (29,30).

2. PROBLEMSTELLUNG

Die meisten organischen Verbindungen zeigen eine mehr oder weniger ausgeprägte UV-Absorption, aber nur eine schwache Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz kann daher meist nicht in der Analytik der Stoffe ausgenutzt werden. Durch Einführung von Gruppierungen mit starker Fluoreszenz können auch schwach oder gar nicht fluoreszierende Stoffklassen mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Besonders bei den modernen chromatographischen Methoden, wie Hochdruck-Flüssigkeits- und Dünnschicht-Chromatographie, wo mit sehr geringen Substanzmengen gearbeitet wird, ist die Fluoreszenzdetektion mit ihrer hohen Empfindlichkeit vorteilhaft einzusetzen.

Amine und Phenole können mit 5-N,N-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonsäurechlorid in stark fluoreszierende Derivate überführt werden (20-24). In Analogie zur Dansylgruppierung soll ein stark fluoreszierendes Naphthalinderivat gesucht werden, mit dem die nicht fluoreszierenden Carbonsäuren zu fluoreszierenden Verbindungen umgesetzt werden können. Die Carboxylfunktion wird auf unterschiedliche Weise an das Naphthalinsystem gebunden. Die Einflüsse der verschiedenen Bindungsarten auf die Fluoreszenz muß hierbei berücksichtigt werden. Zur Steigerung der Fluoreszenz des Naphthalinsystems sollen fluoreszenzverstärkende Substituenten im Ring eingeführt werden.

Die Ester von Carbonsäuren mit 4-Bromomethyl-7-methoxycumarin sind stark fluoreszierende Verbindungen (28). Synthetische und natürliche Fettsäuregemische, die in die 4-Methyl-7-Methoxy-cumarin-ester überführt werden, sollen mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie getrennt und durch Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Dabei soll auch die Empfindlichkeit des Nachweises untersucht werden. Massenspektrometrische und kernresonanzspektroskopische Untersuchungen sollen zur Charakterisierung der Cumarinderivate herangezogen werden.

3. THEORETISCHER TEIL

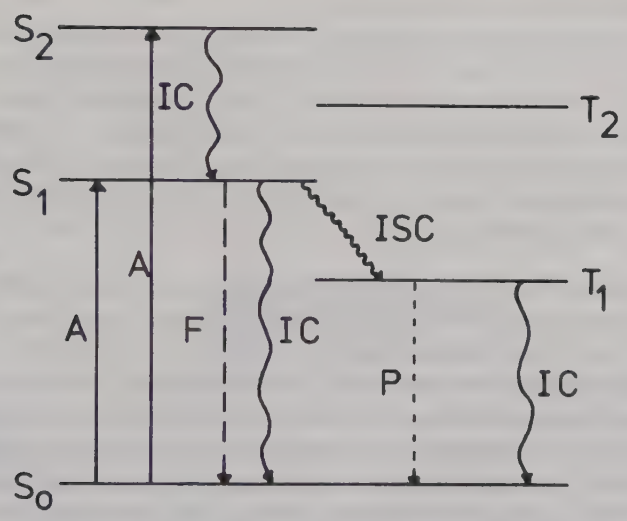
3.1. Fluoreszenz (31-38)

3.1.1. Theoretische Grundlagen der Photoluminiszenz

Als Photoluminiszenz bezeichnet man die Desaktivierung angeregter Moleküle, die sich entweder als spontan auftretende Strahlung, der Fluoreszenz, äußert oder über längere Zeit auftritt (Phosphoreszenz).

Beide Phänomene können mit dem folgenden Energie-Zustands-Diagramm (Abb. 1) erklärt werden.
Dieses wird auch Jablonski-Term-Schema genannt.

Abb. 1: Energie-Zustands-Diagramm



S_o	Singulett-Grundzustand		
S_1, S_2	angeregte Singulett-Zustände		
T_1, T_2	angeregte Triplett-Zustände		
A	Absorption	———	mit Strahlung
F	Fluoreszenz	– – –	mit Strahlung
P	Phosphoreszenz	-----	mit Strahlung
IC	innere Umwandlung (internal conversion)	∿∿	Strahlungslos
ISC	Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität (intersystem crossing)	∿∿	Strahlungslos

Durch die Absorption (A) von Licht bestimmter Wellenlänge wird ein Molekül vom Grundzustand S_o, einem Singulett-Zustand mit gepaarten Elektronen, in einen Singulett-Zustand höherer Energie gebracht.
Wird dabei der zweite angeregte Singulett-Zustand S_2 erreicht, so fällt das Molekül durch innere Umwandlung (internal conversion IC) in den S_1-Zustand zurück. Die hierbei freiwerdende Energie wird hauptsächlich in Form von Schwingungsenergie freigesetzt, die dann durch Stöße an die Umgebung abgegeben werden kann. Dieser Übergang ist also strahlungslos.

Das Molekül kann nun aus dem S_1-Zustand auf zwei strahlungslosen und zwei anderen Wegen, bei denen Strahlung emittiert wird, den Grundzustand S_o erreichen. Die beiden strahlungslosen Übergänge sind das "internal conversion" von S_1 nach S_o und ein "intersystem crossing" von S_1 nach T_1, einem Triplett-Zustand mit ungepaarten Elektronen, gefolgt von einem "internal conversion T_1 nach S_o. Dies kann auch als "intersystem crossing" T_1 nach S_o und nachfolgendem "internal conversion" innerhalb S_o betrachtet werden.
Die beiden Übergänge unter Emission sind Fluoreszenz (F) und Phosphoreszenz (P).

Die Emission, die beim Übergang T_1 nach S_o auftritt, nennt man Phosphoreszenz. Zuvor hat ein "intersystem crossing" S_1 nach T_1 stattgefunden.
Die beim Zurückfallen eines Moleküls von S_1 nach S_o ausgesandte Strahlung wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Lebensdauer des S_1-Zustands und damit die Dauer der Fluoreszenz liegt bei 10^{-7} - 10^{-9} sec. Die Moleküle werden meist in einen energetisch höheren Singulett-Zustand als den S_1-Zustand angeregt. Da der emittierende Übergang jedoch vom S_1-Zustand stattfindet, verliert das Molekül vorher Energie durch "internal conversion". Daraus ergibt sich eine Verschiebung der Fluoreszenz nach größeren

Wellenlängen bezogen auf die Absorption. Diese bathochrome Verschiebung wird als Stoke'sche Verschiebung bezeichnet.

Die oben erwähnten vier verschiedenen Desaktivierungsmöglichkeiten des S_1-Zustandes konkurrieren miteinander. Die Lage und Überlappung der Potentialkurven der verschiedenen Zustände bestimmen Art und Häufigkeit der einzelnen Prozesse. Bei vielen Molekülen ist die strahlungslose Desaktivierung bevorzugt und sie zeigen daher keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz. Der Anteil der fluoreszierenden Moleküle aller angeregten Moleküle wird als Quantenausbeute Ø bezeichnet.

$$\text{Ø} = \frac{\text{fluoreszierende Moleküle}}{\text{angeregte Moleküle}} \qquad (1)$$

Rhodamin B und Fluorescein zeigen z.B. eine Quantenausbeute von fast 100 %. Je höher die Quantenausbeute einer Substanz ist, desto höher ist ihre Fluoreszenz.

3.1.2. Einflüsse auf die Fluoreszenz

a) Molekülstruktur

Die Art und Häufigkeit der Energieübergänge werden direkt von der Molekülstruktur bestimmt. Aromatische und größere konjugierte Doppelbindungssysteme zeigen meist eine starke Fluoreszenz. Je ausgedehnter die Konjugation ist, umso höher ist meist die Quantenausbeute der Fluoreszenz (s.Tab. 1).

Tab. 1: Fluoreszenzquantenausbeuten in EPA-Glas bei 77° K (EPA: Diäthyläther/Isopentan/Äther 5:5:2) (39)

	Ø Fluoreszenz
Benzol	0,11
Naphthalin	0,29
Anthracen	0,46
Tetracen	0,60
Pentacen	0,52

Der erste angeregte Singulett-Zustand S_1, dessen Eigenschaften für die Fluoreszenz bestimmend sind, ist bei stark fluoreszierenden Substanzen ein π,π^*-Zustand. Die Übergangswahrscheinlichkeit von einem π,π^*-S_1-Zustand nach S_o ist groß. Daraus resultiert eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute.
Heteroatome besitzen nicht bindende Elektronen (n). Durch ihren Einfluß kann der S_1-Zustand in einen n,π^*-Zustand überführt werden. Der n , π^*-S_1-Zustand begünstigt das "intersystem crossing" von S_1 nach T_1 stark, sodaß die Fluoreszenz, der S_1-S_o-Übergang, entsprechend abgeschwächt wird.

Die meisten organischen Substanzen, die eine starke Fluoreszenz zeigen, sind Aromaten. Daher ist es interessant, den Einfluß von Substituenten am aromatischen System auf die Fluoreszenz zu betrachten. Hierbei allgemein gültige Feststellungen zu treffen ist schwierig, da die verschiedenen Einflüsse sich gegenseitig überlagern oder sogar aufheben. Ortho-para-dirigierende Substituenten erhöhen meist die Fluoreszenz, während meta-dirigierende sie herabsetzen, meistens sogar unterdrücken.

Tab. 2 zeigt die verschiedenen Substituenten und ihren Einfluß auf die Intensität und Wellenlänge der Fluoreszenz.

Tab. 2: Substituenteneinfluß auf die Fluoreszenz (40)
(bezogen auf den unsubstituierten Kohlenwasserstoff)

Substituent	Änderung der Fluoreszenz-intensität	Verschiebung der Emission
Alkyl	geringe Steigerung oder Senkung	keine
OH, OCH_3, OC_2H_5	Steigerung	bathochrom
NH_2, NHR, NR_2	Steigerung	bathochrom
CN	Steigerung	keine
COOH	starke Erniedrigung	bathochrom
NO_2, NO	starke Erniedrigung	stark bathochrom
SH	Erniedrigung	bathochrom
SO_3H	keine	keine
F) Cl) Br) J)	Erniedrigung	bathochrom

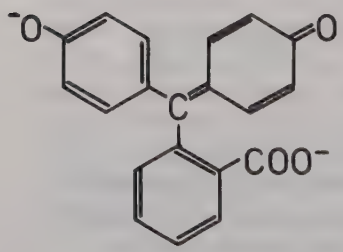
Aus Tab. 2 ist zu entnehmen, daß praktisch nur Hydroxy-, Alkoxy-, Amino- und Alkylamino-Substituenten die Fluoreszenz verstärken. Als Ausnahme ist die Cyano-Gruppe zu nennen, die zwar meta-dirigierend wirkt, jedoch die Fluoreszenz erhöht. Bei ihr liegt der n,π^*-Zustand energetisch höher als der π,π^*-Zustand. Deshalb ist eine stärkere Fluoreszenz möglich.
Praktisch alle Carbonyl-Funktionen, wie Ketone, Aldehyde, Carbonsäuren und Ester unterdrücken die Fluoreszenz, da sie einen n,π^*-S_1-Zustand besitzen.

Die Halogene erniedrigen im allgemeinen die Fluoreszenz, wobei der Effekt vom Fluor zum Jod stark zunimmt. Durch

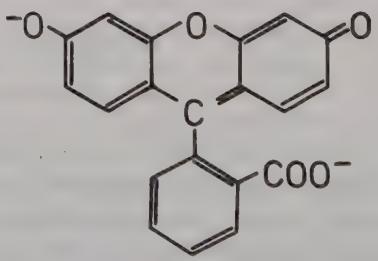
ihren Einfluß werden die S_1-T_1-Übergangsraten gesteigert und die Phosphoreszenz, der T_1-S_o-Übergang, verstärkt. Dies wird üblicherweise als "Schweratom-Effekt" bezeichnet.

Viele Heterocyclen fluoreszieren nicht oder nur schwach, da sie wegen der nicht bindenden Elektronen des Heteroatoms einen n, π^*-S_1-Zustand besitzen. Wenn jedoch die nicht bindenden Elektronen an der Konjugation teilnehmen, erhält man aromatische Heterocyclen mit teilweise sehr starker Fluoreszenz. Durch eine Erhöhung der Molekülstarrheit kann die Fluoreszenzqantenausbeute gesteigert werden, da dabei die strahlungslose Desaktivierung zurückgedrängt wird.

Abb. 2



Phenolphthalein
(nicht fluoreszierend)



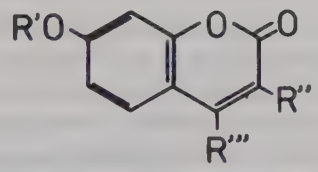
Fluorescein
(fluoreszierend)

Am Beispiel von Phenolphthalein (nicht fluoreszierend) und Fluorescein (fluoreszierend) kann dies verdeutlicht werden (s. Abb. 2). Durch die Verbindung zweier Phenolringe mittels einer Sauerstoffbrücke im Fluorescein wird

ein planares, starres Molekül erhalten, das auch eine erweiterte Konjugation erlaubt. Daraus resultiert die sehr starke Fluoreszenz des Fluoresceins im Gegensatz zum Phenolphthalein (41).

Cumarinsysteme zeigen ebenfalls eine starke Fluoreszenz. Der Einfluß von Molekülstarrheit und Konjugation auf die Fluoreszenz wurde an ihnen untersucht (42). Besonders 7-Hydroxy-cumarine und 7-Alkoxy-cumarine (s. Abb. 3) zeigen eine sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute, was auf den Einfluß des RO-Substituenten zurückzuführen ist.

Abb. 3: 7-Alkoxy-cumarin



b) Lösungsmittel und Temperatur

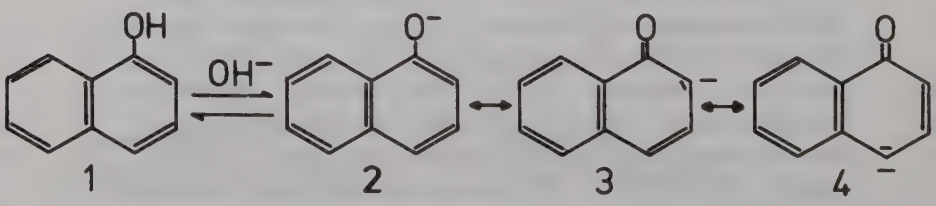
Elektronenübergänge verlaufen erheblich schneller als Kernverschiebungen im Molekül. Deshalb verändert sich während eines Elektronenübergangs (10^{-5} sec.) die Stellung der Kerne praktisch nicht (Frank-Condon-Prinzip). Am Beginn des angeregten Zustands sind daher die Molekülstruktur und die Lösungsmittelumgebung die gleiche wie im Grundzustand. Während der Lebensdauer des angeregten Zustandes (10^{-4} sec.) wird jedoch die Lösungsmittelhülle innerhalb 10^{-11} - 10^{-12} sec. entsprechend der höheren Polarität dieses Zustandes umorientiert. Durch polare Lösungsmittel kann also der angeregte Zustand beeinflußt werden. Hieraus resultiert eine längerwellige Verschiebung der Fluoreszenz mit steigender Lösungsmittel-Polarität.

Im allgemeinen ergibt sich auch eine Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute mit zunehmender Lösungsmittel-Polarität. Oft wird jedoch durch Lösungsmittel wie Alkohole oder Ester die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Kohlenwasserstoffen verstärkt.
Eine spezielle Form des Schweratom-Effekts wird bei der Benützung von halogenhaltigen Lösungsmitteln beobachtet. Obwohl hier das Schweratom nicht Teil des fluoreszierenden Moleküls ist, wird eine Erniedrigung der Fluoreszenz zugunsten der Phosphoreszenz beobachtet.

Steigende Viskosität der Lösungsmittel erhöht die Fluoreszenzintensität, da dabei die strahlungslose Desaktivierung als Konkurrenzmechanismus zurückgedrängt wird.

Den stärksten Einfluß auf die Fluoreszenz üben jedoch Effekte wie Wasserstoffbrückenbindung und Komplexbindung aus. Änderungen des pH der Lösung können drastische Auswirkungen auf die Fluoreszenz hervorrufen. Phenole fluoreszieren in saurem und neutralem Medium stark, während die Phenolate nur noch eine sehr geringe Fluoreszenz zeigen.

Abb. 4: Struktur von Naphthol-(1) in saurem, neutralen umd basischem Milieu



In neutralem oder saurem Medium fluoresziert 1-Naphthol (Struktur 1) stark (s. Abb. 4). Die Fluoreszenzmaxima liegen bei 306 nm (Anregung) und 362 nm (Emission). In alkalischem Medium liegt das Naphtholation in den Strukturen 2-4 vor. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist nur noch sehr gering und die Fluoreszenzmaxima sind längerwellig nach 338 nm (Anregung) und 462 nm (Emission) verschoben.
Naphthochinone in neutraler Lösung zeigen ähnliche Werte, z.B. 2-Methyl-1,4-naphthochinon 335 nm und 480 nm, wie die Naphthole in alkalischem Medium.

Die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz kann bei analytischen Messungen im allgemeinen vernachlässigt werden. Vor allem die temperaturbedingten Viskositätsänderungen der Lösungen beeinflussen die Fluoreszenz. In ungünstigen Fällen, wie z.B. bei einigen substituierten Anthracenen, kann die Fluoreszenzabnahme bei steigender Temperatur bis zu 5 % pro 1° C Temperaturanstieg betragen. Durch thermische Aktivierung wird hier ein S_1-T_1-Übergang hervorgerufen. Dieser Effekt kann jedoch teilweise durch Wahl eines geeigneten Lösungsmittels kompensiert werden.

c) Konzentration

In verdünnten Lösungen steigt die Fluoreszenzintensität mit der Konzentration bis zu einem Grenzwert (ca. 10^{-3} Mol/l) linear an. Bei weiterer Konzentrationserhöhung kann die Fluoreszenzintensität wieder absinken. Man spricht hier vom sogenannten "Konzentrations-Quenching". Dieses Phänomen beruht auf einer Art innerem Filtereffekt. Zum einen wird bei hohen Konzentrationen der größte Teil des eingestrahlten Lichts schon von den Substanzmolekülen in den äußersten Zellschichten absorbiert, sodaß die weiter innen liegenden Moleküle nicht mehr angeregt werden. Zum anderen kann ein Teil der von den angeregten Molekülen

emittierten Strahlung von den nichtangeregten Substanzmolekülen absorbiert werden.

Für die Fluoreszenzintensität F gibt es folgende Gleichung:

$$F = \phi I_o (1 - e^{-\varepsilon d c}) \qquad (2)$$

ϕ = Fluoreszenzquantenausbeute
I_o = Intensität des eingestrahlten Lichts
ε = molarer Extinktionskoeffizient
d = Schichtdicke
c = Konzentration der fluoreszierenden Substanz

Für stark verdünnte Lösungen, also Konzentrationen kleiner als 10^{-3} Mol/l, vereinfacht sich die obige Gleichung zu:

$$F = 2{,}303 \, \phi \, I_o \, \varepsilon \, d \, c \qquad (3)$$

Bei Fluoreszenzmessungen wird nur die emittierte Strahlung gemessen. Bei Absorptionsmessungen jedoch wird das Verhältnis I zu I_o entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz gemessen. Bei sehr niedrigen Konzentrationen nähert sich das Verhältnis I zu I_o dem Wert 1 und kann nur noch schlecht genau gemessen werden. Auch bei geringsten Konzentrationen mißt man bei der Fluoreszenz noch einen verstärkbaren absoluten Wert. Deshalb können bei Fluoreszenzmessungen bis zu 10^{-2}-fach geringere Konzentrationen gemessen werden als mit Absorptionsmessungen.

Bei Fluoreszenzmessungen wählt man am günstigsten eine quadratische Zelle, wobei die emittierte Strahlung senkrecht zur Einstrahlungsrichtung aufgefangen wird. Störungen aufgrund von Lichtstreuung durch Zelle und Lösung sind bei dieser Anordnung am geringsten.

3.2. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Säulenchromatographie zur Substanztrennung mit flüssiger mobiler Phase an festem stationärem Material beruht auf Arbeiten des russischen Botanikers Tswett (1906) (43). Diese Flüssig-Fest-Chromatographie (liquid chromatography, LC) wurde vor allem für präparative Trennungen eingesetzt, da sich für analytische Zwecke die später entwickelten Flachbett-Chromatographie-Verfahren besser eigneten. Die Papierchromatographie wurde um 1940 eingeführt (44) und die Dünnschichtchromatographie (DC) folgte etwa 10 Jahre später (45). Etwa zur selben Zeit wurde auch die Gaschromatographie entwickelt (46), die dann rasch zur meistangewandten analytischen Chromatographiemethode wurde.

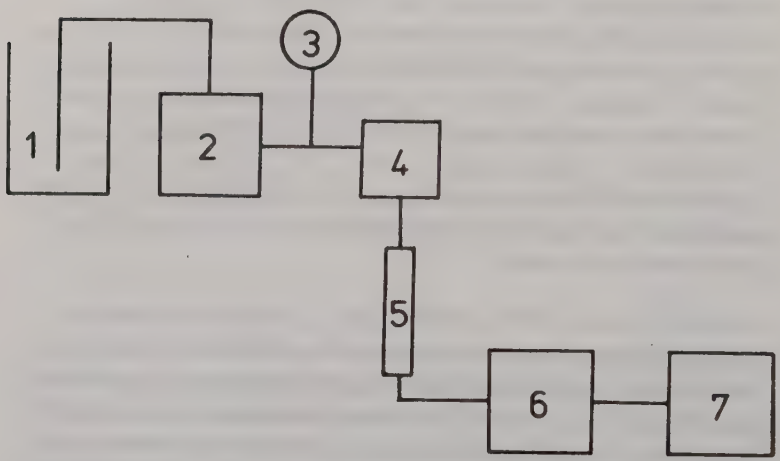
In den letzten Jahren wurde jedoch die Säulenchromatographie wieder verstärkt eingesetzt. Durch die Übertragung theoretischer Erkenntnisse aus der GC auf die LC, die Entwicklung von empfindlichen Detektoren und der verbesserten technischen Ausrüstung konnten mit diesen Verfahren auch befriedigende analytische Trennungen durchgeführt werden (47). Im Jahre 1967 wurde die Methode der Säulenchromatographie zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie ausgebaut (48,49).

3.2.1. Allgemeine Grundlagen der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Bei der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (high performance (pressure) liquid chromatography = HPLC) werden stationäre Phasen benutzt, deren mittlerer Teilchendurchmesser unter 50 µm liegt.
Die verwendeten Säulen haben einen Innendurchmesser von 2 - 6 mm und sind meist aus innen polierten Stahlrohren. Die mobile Phase wird mittels Pumpen mit hohem Druck

(bis zu 400 at) durch die Säule gepreßt.
Abb. 5 zeigt den schematischen Aufbau eines Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen.

Abb. 5: Blockschema eines HPLC-Gerätes



1 Vorratsgefäß mobile Phase
2 Pumpe
3 Manometer
4 Probenaufgabe
5 Trennsäule
6 Detektor
7 Registrierung

Aus dem Vorratsgefäß (1) wird die mobile Phase von der Pumpe (2) mit möglichst konstantem Strom zur Trennsäule (5) gefördert. Der aufgebaute Druck wird direkt hinter der Pumpe vom Manometer (3) gemessen. Die gelöste Probe wird

über die Probenaufgabe (4) (Probenschleife oder Einspritzblock) in die mobile Phase eingebracht und von dieser durch die Säule (5) transportiert.
Dabei werden die einzelnen Komponenten getrennt. Diese werden dann mittels des Detektors (6) nachgewiesen; dies geschieht durch verschiedene physikalische Methoden (Refraktrometrie, UV-Absorption, Fluoreszenz). Das Chromatogramm wird in der Registriereinheit (7) (Kompensationsschreiber, Integrator) aufgezeichnet.

Als Maß für die Trennleistung einer Säule kann die Höhe der theoretischen Böden dienen. Die aus der GC stammende van Deemter-Gleichung (52) beschreibt den Zusammenhang von Bodenhöhe h, Strömungsgeschwindigkeit u des Eluenten und verschiedenen Säulenparametern:

$$h = A + \frac{B}{u} + C_m.u + C_s.u \qquad (4)$$

h = Bodenhöhe
A = Faktor für die Säulenpackung
B = Longitudinal-Diffusionsterm
C_m = Diffussion in der mobilen Phase
C_s = Massentransport der stationären Phase
u = Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase

Der A-Term berücksichtigt den Einfluß der unterschiedlichen Strömungen in der körnigen Säulenfüllung (Eddy-Diffusion) und ist nur von Art und Güte der Säulenpackung abhängig.
Die Longitudinaldiffusion wird durch den B-Term einbezogen. Bei Teilchengrößen < 10 µm und Strömungsgeschwindigkeiten $> 0{,}5$ cm/sec kann dieser Term in der Flüssigkeits-Chromatographie meist vernachlässigt werden.
Die C-Terme sind Ausdruck der geschwindigkeitsproportionalen, axialen Diffusion in der bewegten Phase (C_m) und der Sorption bzw. Desorption an der stationären Phase (C_s). Um den C-Term, d.h. die Diffusion möglichst klein zu

halten, können nur die Diffusionswege verkürzt werden. Deshalb verwendet man kleine Partikel mit geringen Porentiefen.

Für einen beschränkten Geschwindigkeitsbereich wurde eine empirische Näherungsgleichung gefunden (53, 54):

$$h = D \cdot u^x \qquad (5)$$

Die Konstante D enthält die Terme A und C der obigen Gleichung (4). Der Wert für x kann zwischen 0,3 und 0,6 schwanken. Die Bodenhöhe und damit die Trennleistung nimmt also mit steigender Fließgeschwindigkeit ab.
Die Bodenhöhe einer gegebenen Säule wird aus der Anzahl der theoretischen Böden der Säule über folgende Beziehung errechnet:

$$h = \frac{L}{n} \qquad (6)$$

n = Bodenzahl
L = Säulenlänge

Für die Berechnung der Bodenzahlen hat sich die folgende Formel als praktisch erwiesen:

$$n = 5{,}54 \left(\frac{t_r}{W_{0,5}}\right)^2 \qquad (7)$$

t_r = Retentionszeit
$W_{0,5}$ = Peakbreite in halber Höhe

Die Retentionszeiten t_r allein lassen keine Substanzzuordnung zu, da sie von Säulenlänge und Fließgeschwindigkeit abhängig sind. Erst ihre Verknüpfung mit der Totzeit t_o, die für alle Stoffe gleich ist, läßt allgemeinere Schlüsse zu. Dadurch kommt man zu den fundamentalen Parametern der Flüssigkeitschromatographie, den Kapazitätsfaktoren k':

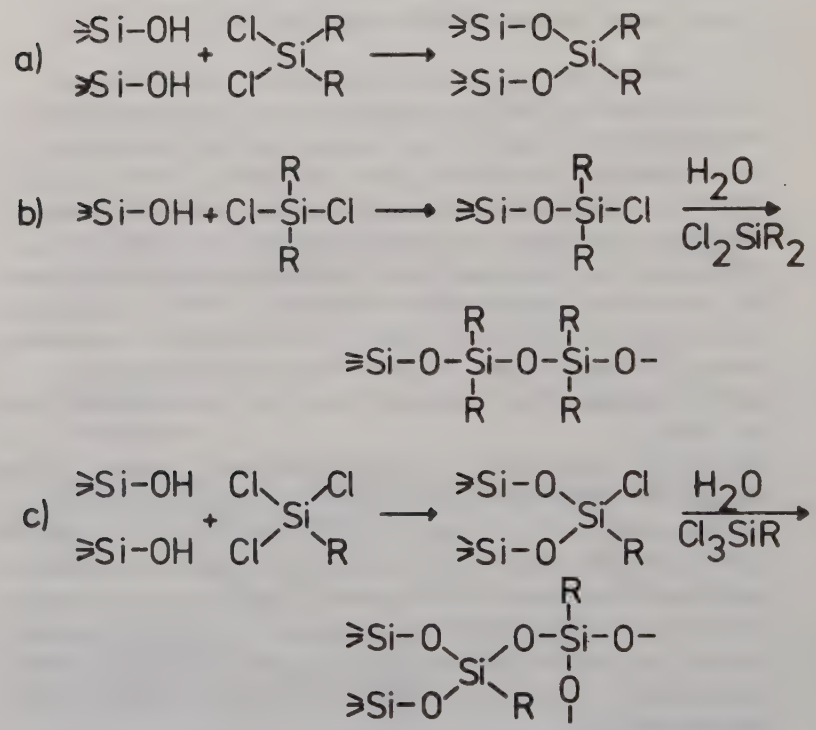
$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o} \qquad (8)$$

Der k'-Wert einer Substanz wird durch das Verhältnis der Aufenthaltszeiten (Aufenthaltswahrscheinlichkeiten) in der stationären und mobilen Phase bestimmt. Man bezeichnet ihn auch als Massenverteilungsverhältnis.

3.2.2. Reversed-Phase-Chromatographie

Die Bezeichnung "reversed phase" stammt aus der Papierchromatographie (55). Es werden hierbei im Gegensatz zur Adsorptionschromatographie unpolare stationäre und mehr oder minder polare mobile Phasen verwendet. Daher wird die Elutionsreihenfolge bei "reversed phase" umgekehrt, verglichen mit polaren stationären Phasen. Bis 1969 konnten die unpolaren Phasen nur durch Belegung von polaren Trägern mit unpolaren Flüssigkeiten hergestellt werden (56). Um eine zu starke Abspülung dieser Imprägnierung zu verhindern, mußte die mobile Phase mit der Belegungsflüssigkeit gesättigt werden. Dies schränkte natürlich die Anwendung stark ein (51).
Mit der Entwicklung von chemisch gebundenen Phasen 1969 durch Halász und Sebestian ergaben sich für die Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) völlig neue Perspektiven. Die kovalent auf dem Träger gebundenen hydrophoben Phasen sind thermisch und gegen Hydrolyse relativ stabil, sodaß sie die chromatographischen Bedingungen kaum einengten. Für die Verwendung in der HPLC haben sich vor allem die chemisch modifizierten mikroporösen Silikagele bewährt, sie werden immer häufiger eingesetzt (57).
Unpolare Gruppen können durch Reaktion von Alkylchlorsilanen mit den Hydroxylgruppen der Kieselgeloberfläche eingeführt werden. Alkyldichlorsilane und Alkyltrichlorsilane werden meist zur Reaktion benutzt (58).
Abb. 6 zeigt die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten der Di- und Trichlorsilane mit der Kieselgeloberfläche.

Abb. 6: Reaktionsmöglichkeiten der Silanolgruppen mit Alkylchlorsilanen (51, 58)



Dichlordialkylsilane ergeben meist eine "monomere" Phase, d.h. die einzelnen Teilchen besitzen eine bürstenartige, monomere Bedeckung mit den Alkylgruppen (Abb. 6 a). Die monomeren Phasen sind in ihren chromatographischen Eigenschaften denen der Festkörper sehr ähnlich.

Durch Wahl der Reaktionsbedingungen lassen sich mit Dichlordialkylsilanen jedoch auch "polymere" Phasen herstellen (Abb. 6 b). Die Oberfläche besteht hierbei aus chemisch gebundenen Polysiloxanen. Da bei Trichloralkylsilanen aus sterischen Gründen nur zwei Chloratome mit der Oberfläche reagieren können, erhält man überwiegend polymere Phasen (Abb. 6 c). Die Polymerisation kann durch eine definierte Wasserzugabe gesteuert werden, sodaß verschieden dicke gebundene Filmschichten erhalten werden können. Die polymeren Phasen können mehr als Verteilungssysteme betrachtet werden, so wie die mit Flüssigkeiten physikalisch belegten Festkörper.

Die monomeren Phasen werden am meisten angewandt. Ihre Effektivität ist größer als die der polymeren, da die Diffusion in der stationären Phase höher ist.
Der Trennungsmechanismus der Reversed-Phase-Chromatographie ist noch nicht eindeutig geklärt. Zwei verschiedene Mechanismen werden hauptsächlich diskutiert (58). Die Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen (mobiler und stationärer) ist der erste mögliche Mechanismus. Die RPC wäre damit eine Art Flüssig-Flüssig-Chromatographie (59). Dieser Mechanismus wird vor allem bei polymeren Phasen angenommen. Die zweite Möglichkeit ist die Adsorption an der unpolaren stationären Phase. Diese Adsorption beruht jedoch nicht wie bei der klassischen Chromatographie auf spezifischen polaren Wechselwirkungen zwischen Substanz und stationärer Phase, sondern die relativ schwachen Wechselwirkungen basieren auf Van der Waal'schen Kräften (Dispersionskräfte). Hauptsächlich bei monomeren Phasen ist die Trennung auf diesen zweiten Mechanismus zurückzuführen (60, 61).

Die Reversed Phase HPLC bietet einige Vorteile im Vergleich zur Chromatographie mit polaren stationären Phasen. Sie ermöglicht Trennungen von sehr polaren Substanzen, die

auf polaren Trägern irreversibel gebunden werden. Auch unpolare Substanzen, die an polaren Säulen kaum retardiert werden, können mit der RPC aufgetrennt werden (62). Die Gradientenelution ist sehr einfach und schnell durchzuführen. Die Ausgangsbedingungen lassen sich in sehr kurzer Zeit wieder erreichen. Geringe Schwankungen des Wassergehalts der Lösungsmittel haben keinen Einfluß auf die Trennungen.

4. ALLGEMEINER TEIL

4.1. Naphthalinderivate zur Fluoreszenzmarkierung

Das Naphthalin selbst zeigt nur eine schwache Fluoreszenz. Fluoreszenzquantenausbeuten zwischen 0,5 und fast 1 werden jedoch bei einigen substituierten Naphthalinen beobachtet, so den Naphtholen und Amino-naphthalin-sulfonsäuren (63,64). In der Analytik werden schon seit längerem verschiedene stark fluoreszierende Naphthalinderivate eingesetzt, z.B. 5-N,N-Dimethylamino-naphthalin-sulfonsäure-chlorid für Amino- und Phenol-Gruppen (25) oder N-(4-anilino-1-naphthyl)maleinsäureimid als Fluoreszenzsonde bei Enzym- und Proteinuntersuchungen (38). Die bekannten Naphthalinderivate mit starker Fluoreszenz bilden jedoch mit Carbonsäuren keine stabilen Verbindungen. Essigsäure wurde mit den verschiedenen untersuchten Naphthalinderivaten umgesetzt, da die Essigsäure keine Eigenfluoreszenz zeigt.

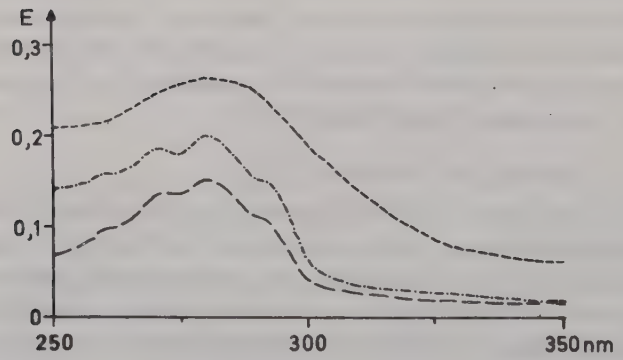
4.1.1. Bindung der Säurefunktion

Für die möglichst einfache Bindung von Carbonsäuren an Naphthaline bieten sich drei verschiedene Bindungsarten an. Zwei unterschiedliche Ester können mit Carbonsäuren gebildet werden, die einmal vom Naphthol ausgehen oder von einem Hydroxylalkylnaphthalin abgeleitet werden können. Die Bildung von Naphthylamiden ist die dritte Möglichkeit für die Bindung von Carbonsäuren. Als Modellverbindungen wurden die jeweils in 1-Stellung substituierten Naphthaline gewählt.
Aus α-Naphthol wurde α-Naphthylacetat hergestellt. Durch die Umsetzung von Acetylchlorid mit α-Naphthylamin erhielt man α-Naphthylacetamid. Die Veresterung von 1-Chlor-methylnaphthalin mit Essigsäure ergab den Eissigsäure-1-methyl-naphthylester.

Die drei Verbindungen zeigen sehr ähnliche UV-Spektren (Abb. 7). Die Absorptionsmaxima liegen bei allen bei

ungefähr 280 nm. α-Naphthylacetamid hat die höchste Absorption. Die einander sehr ähnlichen Spektren der beiden Ester enthalten sehr ausgeprägte Bandenschultern. Die Extinktionsunterschiede zwischen ihnen sind nur sehr gering.

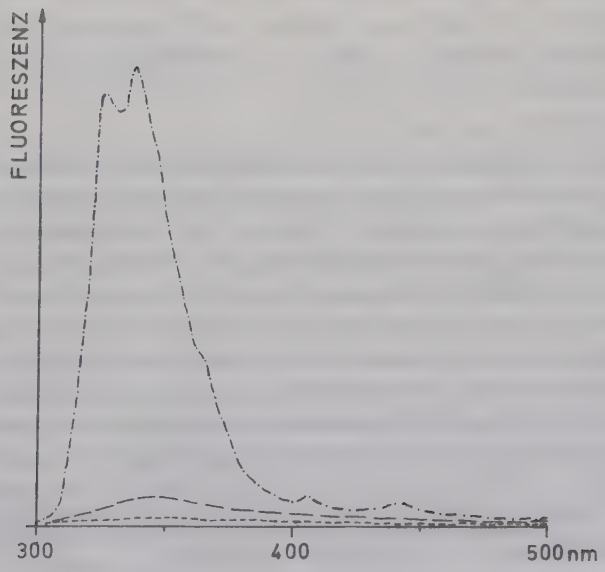
Abb. 7: UV-Spektren von α-Naphthylacetamid (------), α-Naphthylacetat (— — —) und Essigsäure-1-methyl-naphthylester (-.-.-.-.) (10^{-5} Mol/l in Methanol)



Beim Vergleich der Fluoreszenzspektren der drei genannten Verbindungen ergaben sich jedoch ganz andere Verhältnisse. α-Naphthylacetat und α-Naphthylacetamid zeigen praktisch keine Fluoreszenz, wobei das Amid trotz der stärkeren Absorption die niedrigeren Werte zeigt (s. Abb. 8). Dieser Effekt ist durch die direkte Bindung der Carboxylfunktion an das Naphthalinringsystem zu erklären.

Das Fluoreszenzspektrum von Essigsäure-1-methylnaphthylester zeigt zwei Maxima bei 325 und 340 nm. Die Fluoreszenz, obwohl sehr viel stärker als die der beiden anderen Verbindungen, ist jedoch für die Fluoreszenzdetektion nicht hinreichend stark. Da der fluoreszenzmindernde Effekt der Carboxylfunktion nicht über die Alkylgruppe auf das Ringsystem einwirkt, können also fluoreszenzverstärkende Substituenten im Naphthalin eingeführt werden.

Abb. 8: Fluoreszenzspektren von α-Naphthylacetamid (----), α-Naphthylacetat (— — —) und Essigsäure-1-methylester (-.-.-.-) (Anregung 280 nm; durchschnittliche Bandenbreite 4 nm; 10^{-5} Mol/l in Methanol)



4.1.2. Substituenten in Naphthalin

Als fluoreszenzverstärkende Substituenten sind die Hydroxy- bzw. Alkoxy und Amino- bzw. Alkylamino-Gruppierungen sowie die Cyanogruppe möglich (s. Tab. 2). Wegen der starken pH-Abhängikeit ihrer Fluoreszenz sind die Hydroxy- und Aminogruppe als Substituenten nicht gut geeignet. Es wurden daher die Methoxy- und Dimethylamino-Funktionen bevorzugt. Die Substitution wurde in 4-Stellung durchgeführt, da hier anscheinend der größte Effekt zu erzielen ist (63).
Eine Halogenmethylgruppe wird als reaktives Zentrum für die Esterbildung eingeführt.

Als einfachste Reaktion, um zu 4-Methoxy-1-chlor-methylnaphthalin zu gelangen, bot sich die Chlormethylierung von 1-Methoxynaphthalin an. Bei dieser Reaktion, unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, wurde aber nicht das gewünschte Chlormethyl-Produkt, sondern ein Diarylmethan erhalten. Die isolierte Substanz ist wahrscheinlich Bis-(4-Methoxy-naphthyl-1)-methan. Chlormethylierungen an Methoxynaphthalin in anderen Arbeiten (65,66) führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Bei einer weiteren Synthese wurde dann vom 1-Methyl-naphthalin ausgegangen. Das 1-Methyl-naphthol-4 wurde entsprechend den Arbeiten von Steiger (67) und Elbs und Christ (68) dargestellt. Durch Sulfonierung von 1-Methyl-naphthalin zum 1-Methyl-naphthyl-kaliumsulfonat-4, das anschließend einer Alkalischmelze unterworfen wurde, erhielt man das 1-Methylnaphthol-4. Nach dessen Methylierung wurde versucht, an der Methylgruppe mit N-Bromsuccinimid ein Brom einzuführen, um zu der gewünschten Halogenmethylgruppierung zu gelangen. Das 4-Methoxy-1-methyl-naphthalin wurde jedoch in 3-Stellung im Kern bromiert und nicht wie erwartet, in der Seitenkette. Das 4-Methoxy-3-bromo-1-methyl-naphthalin konnte durch Protonenresonanz identifiziert werden.

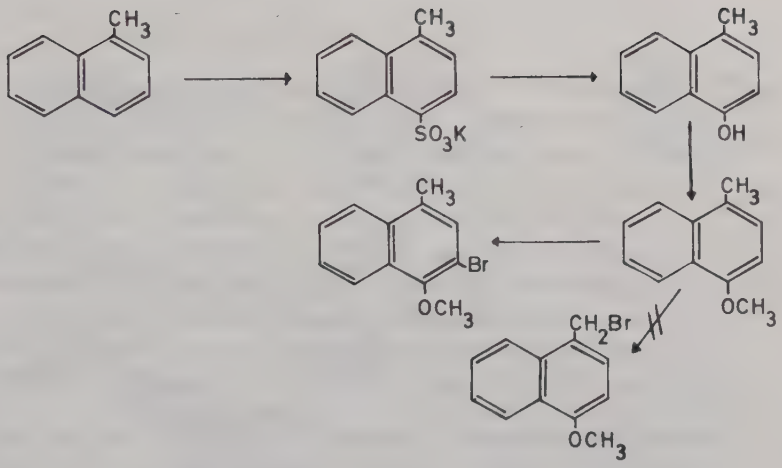


Abb. 9: Syntheseweg für das 4-Methoxy-1-methyl-naphthalin

Die Nitrierung von 1-Methylnaphthalin nach Thompson (69) führte neben anderen Isomeren zu 4-Nitro-1-methyl-naphthalin. Durch Ausfrieren und Umkristallisieren ist das 4-Nitro-Produkt isomerenfrei zu erhalten. Die Reduktion mit Hydrazinhydrat ergab das seit längerem bekannte 4-Amino-1-methyl-naphthalin (70). Bei der Methylierung mit Dimethylsulfat erhielt man das 4-N,N-Dimethylamino-1-methyl-naphthalin. Die Bromierung dieser Substanz, wobei die Bedingungen variiert wurden, führte ebenso wie beim 4-Methoxy-1-methyl-naphthalin nur zu einem kernbromierten Produkt. Es konnte ein 4-N,N-Dimethylamino-3-bromo-1-methyl-naphthalin isoliert werden.

Buu-Hoï et.al. (71,72) beobachteten bei Reaktionen von N-Brom-Succinimid mit ähnlichen Naphthalinverbindungen ebenfalls Kernbromierungen.

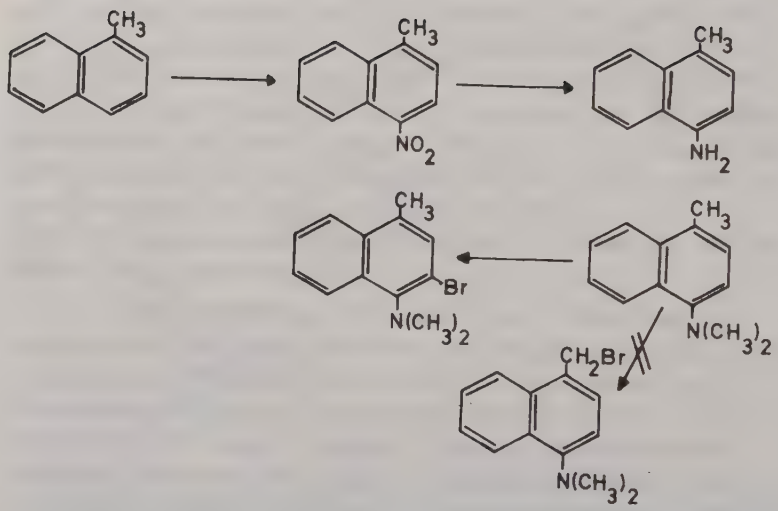


Abb. 10: Syntheseweg für das 4-N,N-Dimethylamino-1-methyl-naphthalin

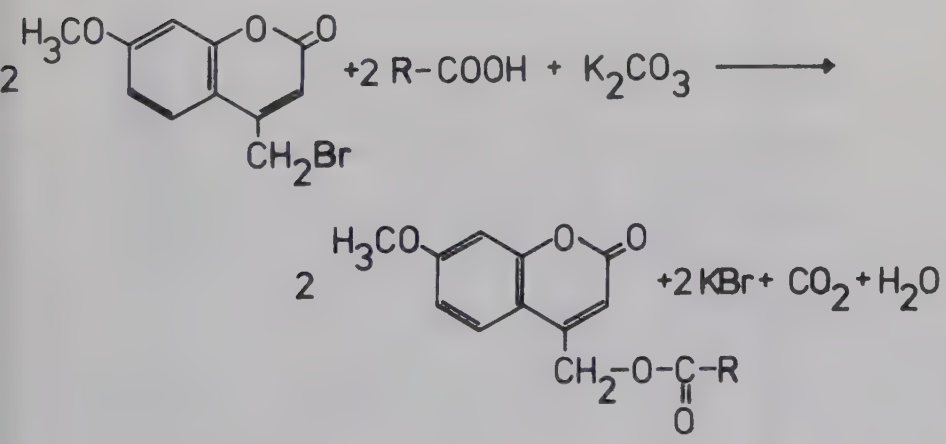
4.2. 4-Methyl-7-Methoxy-Cumarin-Ester

4.2.1. Reaktion und Detektion

4-Bromomethyl-7-methoxy-cumarin (Br-MMC = 4-Bromomethyl-7-methoxy-2 oxo-2H-benzopyran) wurde von Dey und Radhabai (73) 1934 als Reagens für das Fluorescence Labelling eingeführt. Ihre Versuche, das Brom der Bromomethylgruppe mit Hydroxyl- und Aminogruppen umzusetzen, verliefen erfolglos. 1971 benutzten Secrist et al. (74) Br-MMC zur Fluoreszenz-Markierung von Thiouracilen, um Konformations- und Funktionsuntersuchungen an t-RNA durchführen zu können. In den letzten zwei Jahren benutzten Dünges et al. (28-30) Br-MMC zum Fluorescence Labelling von Carbonsäuren.

Carbonsäuren reagieren mit Br-MMC in Gegenwart von Kondensationsmitteln zu den entsprechenden 4-Methyl-7-methoxy-cumarin-estern (MMC-Ester = 7-Methoxy-2-oxo-2 H-benzopyran-methyl-ester) (Abb.11).

Abb. 11: Reaktionsgleichung für die Bildung der 7-Methoxy-4-methyl-cumarin-ester

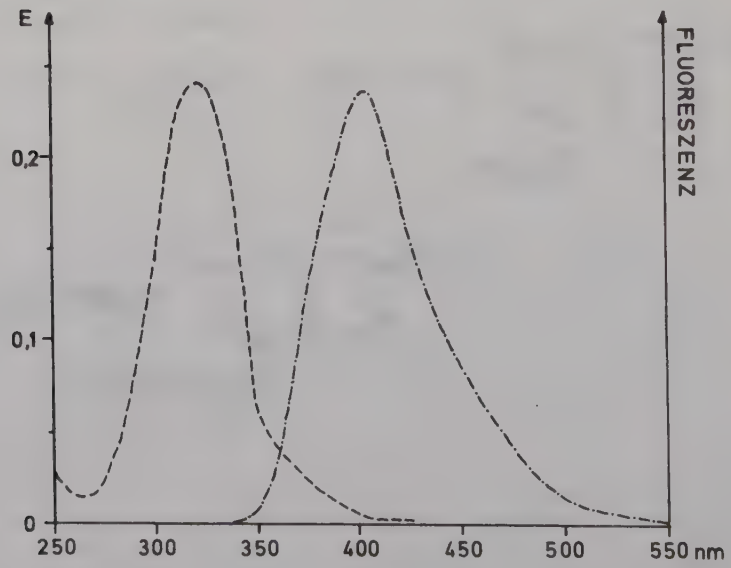


Als Kondensationsmittel wird meistens K_2CO_3 verwendet. Cäsiumcarbonat erwies sich ebenfalls als geeignet, während mit Na_2CO_3 keine Reaktion beobachtet werden konnte. Um eine möglichst vollständige Umsetzung der Carbonsäuren zu erreichen, wird die Veresterung mit einem Überschuß an Br-MMC durchgeführt. Mit Kaliumcarbonat als Kondensationsmittel werden die Reaktionspartner in Aceton eine Stunde unter Rückfluß erhitzt (29).

Die MMC-Ester fluoreszieren in Lösung oder auf Dünnschichtplatten sehr intensiv. Die meisten MMC-Ester zeigen eine blaue Fluoreszenz.

Anregungs- und Emissionsspektren von Myristinsäure-MMC-ester (CH_3-$(CH_2)_{12}$-COO-MMC) wurden in methanolischer Lösung gemessen (Abb. 12).
Das Absorptionsmaximum liegt bei ungefähr 325 nm. Bei 410 nm wird die höchste Emission beobachtet.

Abb. 12: Absorptions- (----) und Emissionsspektrum (-·-·-) von Myristinsäure-MMC-Ester in Methanol (10^{-5} Mol/l) (Anregung bei 313 nm)



Die Lage der Anregungs- und Emissionsmaxima begünstigen die Detektion der MMC-Ester, da die meisten kommerziellen Geräte in den genannten Bereichen messen.

4.2.2. HPLC der MMC-Ester

Die HPLC bietet sich zur Trennung der MMC-Ester besonders an, da mit ihr sehr gute Trennungen erreicht werden und gleichzeitig auch geringe Mengen durch einen angeschlossenen Fluoreszenzdetektor nachgewiesen werden können.
Für die Trennung von langkettigen Fettsäureestern ist die Reversed-Phase-Chromatographie besonders geeignet. Die MMC-Ester der verschiedenen Säuren wurden an einer RP-8-Säule, einem Kieselgel mit gebundenem Oktan-Rest, mit zwei Eluenten, Methanol und Wasser, getrennt. Um eine befriedigende Auftrennung der einzelnen MMC-Ester in vertretbarer Zeit zu erhalten, wurde eine Gradientenelution durchgeführt. Dabei wird der Methanol-Anteil während der Trennung linear gesteigert. Die Detektion erfolgte entweder durch einen Filterdetektor mit Cut-Off-Filter, Anregung bei 366 nm und Emission $>$ 405 nm, oder mit einem variablen Fluoreszenzdetektor, wobei bei 325 nm angeregt und die Emission bei 410 nm gemessen wird.

Die Abb. 13 zeigt das Elutionsprofil von Fettsäure-MMC-estern. Die Peaks 1 - 3 stammen von Br-MMC und aus Nebenreaktionen des überschüssigen Br-MMC's.
Die Kettenlängen der Fettsäuren variieren von C_6 bis C_{22}. Außerdem enthält die Mischung noch drei ungesättigte C_{18}-Säuren, Oel-(1-fach ungesättigt), Linol-(2-fach ungesättigt) und Linolensäure (3-fach ungesättigt).

Abb. 13: Elutionsprofil der Fettsäure-MMC-ester

(1,2,3) Br-MMC u. Nebenprodukte, (4) Capronsäure C_6, (5) Önanthsäure C_7, (6) Caprylsäure C_8, (7) Pelargonsäure C_9, (8) Caprinsäure C_{10}, (9) Laurinsäure C_{12}, (10) Myristinsäure C_{14} + Linolensäure $C_{18:3}$, (11) Linolsäure $C_{18:2}$, (12) Palmitinsäure C_{16}, (13) Oelsäure $C_{18:1}$, (14) Stearinsäure C_{18}, (15) Nonädecansäure C_{19}, (16) Arachinsäure C_{20}, (17) Behensäure C_{12}. Säule: LiChrosorb RP 8 (5 µm), 25 cm x 4,6 mm; Temperatur: 22°C, Fluß: 1 ml/min, Detektor: 325 nm/410 nm; Eluent: Methanol/Wasser, Gradient: 80/20 linear nach 95/5, Gradientenzeit: 10 min.

Die Trennung der Fettsäure-MMC-ester geschieht nach den folgenden Kriterien:
Erstens werden die gesättigten MMC-Ester nach der Kettenlänge der Säureester getrennt, wobei die Retentionszeit mit zunehmender Kettenlänge ansteigt. Dies zeigen in Abb.13 z.B. die Peaks 4 bis 9, die die MMC-Ester der C_6- bis C_{12}-säuren darstellen.
Zweitens sinkt das Retentionsvolumen mit steigender Anzahl von Doppelbindungen im Säurerest. Aus den Retentionsdaten der MMC-Ester der vier C_{18}-Säuren (Peaks 10,11,13,14) kann dies ersehen werden. Die k'-Werte der einzelnen MMC-Ester (Tab. 3) für zwei verschiedene Gradientenprogramme unterstützen diese Aussagen ebenfalls.
Die k'-Werte wurden nach der Formel 8:

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

berechnet. Als Totzeit t_o wurde die Retentionszeit von Br-MMC (Peak 1 in Abb. 13) eingesetzt.

Die k'-Differenzen der einzelnen MMC-Ester variieren nur bei den kurzen und den längeren Fettsäurestern zwischen den beiden unterschiedlichen Gradienten. Im kritischen Bereich bei den mittleren und ungesättigten Fettsäuren ergeben sich keine Unterschiede, so daß dem linearen Gradienten wegen der kürzeren Trennzeit bei gleicher Auflösung der Vorzug zu geben ist. Die k'-Werte von Myristin- und Linolensäure-MMC-Ester sind unter diesen Bedingungen gleich. An der benutzten RP-8-Säule mit einem MeOH/H_2O-Gemisch ließen sich diese beiden Ester auch durch die unterschiedlichen Trennbedingungen nicht auftrennen. Ähnliche Phänomene wurden mit anderen Fettsäureestern schon an C_9- und C_{18}-Säulen beobachtet (75-77).

Tab. 3 : k'-Werte der Fettsäure-MMC-ester

Säure	Anzahl der C-Atome	k'-Werte 1	2
Capron-	6	1,11	1,11
Önanth-	7	1,53	1,64
Capryl-	8	1,94	2,33
Pelargon-	9	2,3	3,02
Caprin-	10	2,62	3,58
Laurin-	12	3,18	4,2
Myristin-	14	3,65	4,58
Linolen-	18 (3 Do.bi.)		
Linol-	18 (2 Do.bi.)	3,86	4,82
Palmitin-	16	4,03	5,0
Oel-	18 (1 Do.bi.)	4,14	5,1
Stearin-	18	4,48	5,48
Nonadecan-	19	4,73	5,79
Arachin-	20	5,06	6,1
Behen-	22	5,81	7,1

Trennbedingungen: 1) wie in Abb. 13
2) wie 1) außer Gradient: Waters Programm Nr.8
Zeit: 15 min.

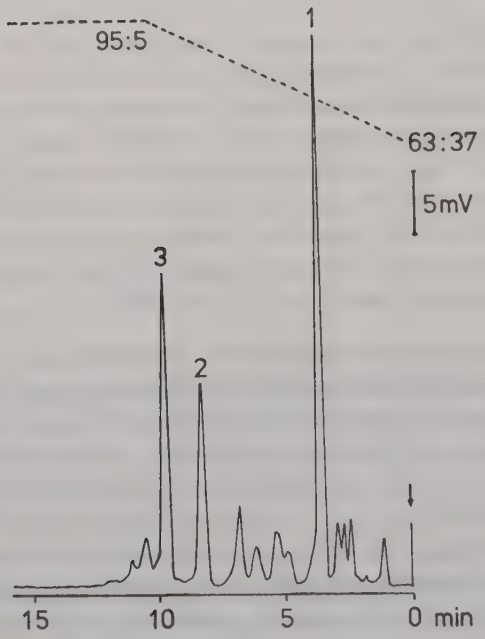
Die Anfangszusammensetzung des Eluenten Methanol/Wasser 80:20 bietet bei guter Trennung eine kurze Trennzeit. Bei niedrigerem Methanolanteil wird die Trennzeit größer und die niedrigen MMC-Ester (Peaks 4-8 in Abb. 13) werden später eluiert, ohne daß im kritischen Bereich (Peaks 10-13 in Abb.13) die Trennung verbessert wird. Beginnt man die Trennung mit einem Methanolanteil > 80%, dann werden die vorderen Komponenten nicht mehr aufgetrennt.
Eine Gradientenzeit von 10 min. erwies sich für diese

Trennung als günstig. Längere Gradientenzeiten führen zu einer Verbreiterung der Peaks der höheren MMC-Ester (Peaks 15-17 in Abb. 13). Bei kürzeren Gradientenzeiten wird die Auflösung im mittleren Bereich erheblich schlechter.

Bei der Trennung von niederen MMC-Estern muß der Methanolanteil am Anfang geringer sein, da sie sonst zusammen mit Br-MMC und dessen Nebenprodukten eluiert werden. Besonders der Essigsäure-MMC-ester wird sehr früh eluiert (Peak 1 in Abb. 14). Die Anfangszusammensetzung von MeOH/H_2O 67/33 erwies sich auch für die Trennung der MMC-Ester von Benzoesäure (Peak 4) und Phenylessigsäure (Peak 3) günstig. Die kleineren Peaks in Abb.14 stammen von Verunreinigungen der aromatischen Säuren und des Br-MMC's.

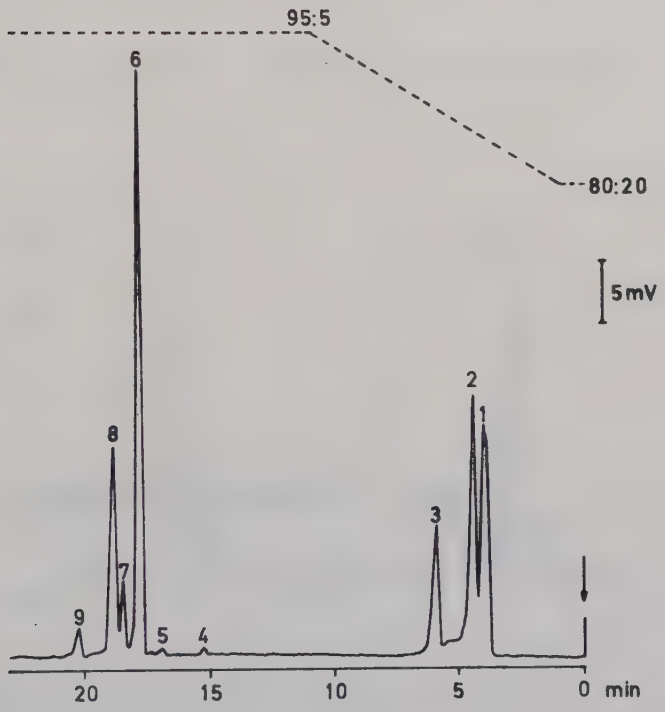
Unter den gleichen Trennbedingungen wie in Abb.13 für die synthetische Fettsäure-MMC-ester-Mischung wurden die MMC-Ester der Fettsäuren zweier natürlicher Fette getrennt. Die Trennung der Fettsäure-MMC-ester von Sonnenblumenöl zeigt Abb. 15. Zwei ungesättigte C_{18}-Fettsäuren, Linol-$C_{18:2}$ und Oelsäure $C_{18:1}$, sind die Hauptkomponenten. Die vier gesättigten C_{12}- bis C_{18}-Säuren sind in diesem öl nur in niedriger Konzentration vorhanden. Niedrigere Fettsäuren als Laurinsäure C_{12} sind in der erfaßbaren Konzentration, die unter diesen Bedingungen bei ungefähr 1% der Hauptkomponente liegt, im Sonnenblumenöl nicht enthalten.
Abb.16 zeigt das Elutionsprofil der Fettsäure-MMC-Ester von ausgelassenem Entenfett. Auch hier stellen ungesättigte Fettsäuren die Hauptkomponenten, die beiden ungesättigten C_{18}-Säuren, Oel- und Linolsäure sowie Palmitoleinsäure $C_{16:1}$. Der Anteil der gesättigten ist jedoch fast gleich hoch. Der niedrige Schmelzpunkt des hydrolisierten Entenfetts (bei Raumtemperatur flüssig) läßt sich durch den hohen Anteil von ungesättigten Fettsäuren erklären. Die mit klassischen Fettuntersuchungsmethoden gewonnenen Ergebnisse stimmen mit den hier gefundenen überein (78,79).

Abb. 14: Chromatogramm der MMC-Ester organischer Säuren



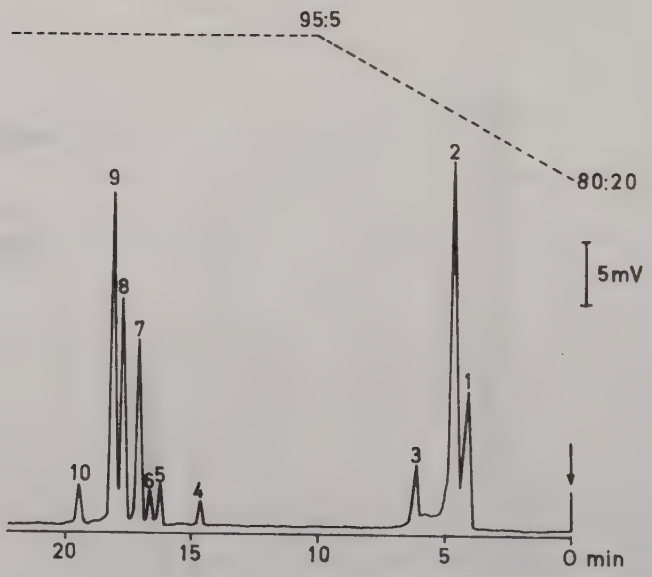
(1) Essigsäure, (2) Phenylessigsäure, (3) Benzoesäure,
Säule: LiChrosorb RP 8 (7 µm), 25 cm x 3,1 mm
Temperatur: 22°C, Fluß: 1 ml/min, Detektor: 366 nm/ 405 nm,
Eluent: Methanol/Wasser, Gradient: 63/37 linear nach 95/5
Gradientenzeit: 10 min.

Abb. 15: Trennung der Fettsäure-MMC-ester von Sonnenblumenöl



(1,2,3) Br-MMC und Nebenprodukte, (4) Laurinsäure, (5) Myristinsäure, (6) Linolsäure, (7) Palmitinsäure, (8) Oelsäure, (9) Stearinsäure.
Eingespritzte Menge bezogen auf die freien Fettsäuren: 4.10^{-8} g; Säule: LiChrosorb RP 8 (5 µm), 25 cm x 4,6 mm, Temperatur: 22°C; Fluß: 1 ml/min; Detektor: 325 nm/410 nm; Eluent: Methanol/Wasser; Gradient: 80:20 linear nach 95:5 Gradientenzeit: 10 min.

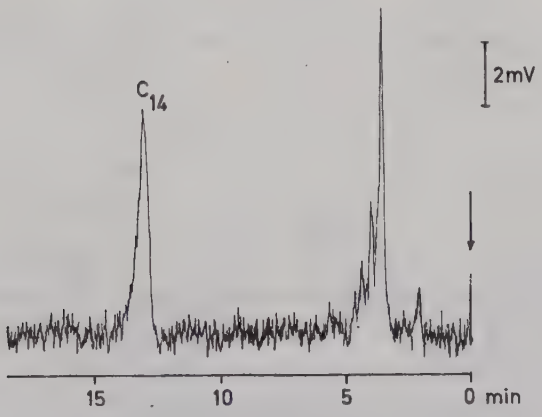
Abb. 16: Trennung der Fettsäure-MMC-ester von Entenfett



(1,2,3) Br-MMC und Nebenprodukte, (4) Laurinsäure, (5) Myristinsäure, (6) Palmitoleinsäure $C_{16:1}$, (7) Linolsäure, (8) Palmitinsäure, (9) Oelsäure, (10) Stearinsäure. Eingespritzte Menge bezogen auf die freien Fettsäuren: $3{,}7.10^{-8}$ g; Säule: LiChrosorb RP 8 (5 µm), 250 cm x 4,6 mm; Temperatur: 22°C; Fluß: 1 ml/min; Detektor: 325 nm/410 nm; Eluent: Methanol/Wasser; Gradient: 80:20 linear nach 95:5; Gradientenzeit: 10 min.

Aufgrund der starken Fluoreszenz der MMC-Ester lassen sich auch noch geringe Mengen nachweisen. So konnten mit der für die Trennungen benutzten Apparatur bis zu 10^{-16} Mol Myristinsäure-MMC-ester nachgewiesen werden (s. Abb. 17). Dieser Wert entspricht 4.10^{-14}g der freien Säure.

Abb. 17: Elutionsprofil von 10^{-16} Mol Myristinsäure-MMC-ester



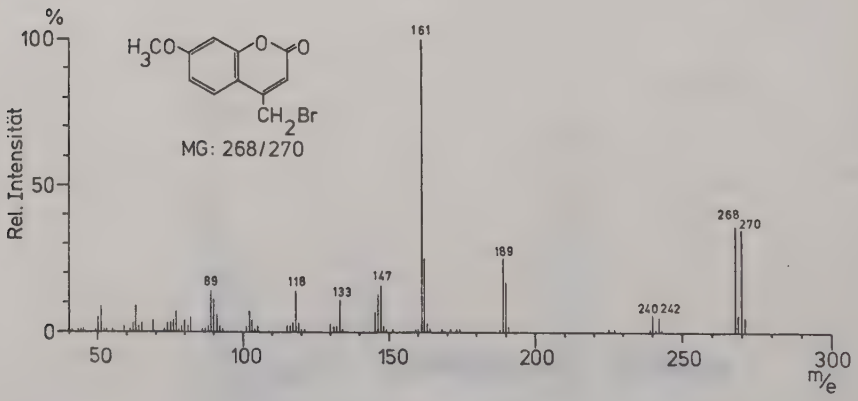
Isokratische Elution mit Methanol/Wasser 90/10
Sonstige Bedingungen wie in Abb. 13.

4.2.3. Massenspektrometrische Untersuchungen

Mit Hilfe der Massenspektrometrie lassen sich auch noch Substanzmengen von 10^{-8} g identifizieren (80). So können auch die nach HPLC-Trennungen anfallenden Substanzen noch massenspektrometrisch untersucht werden.

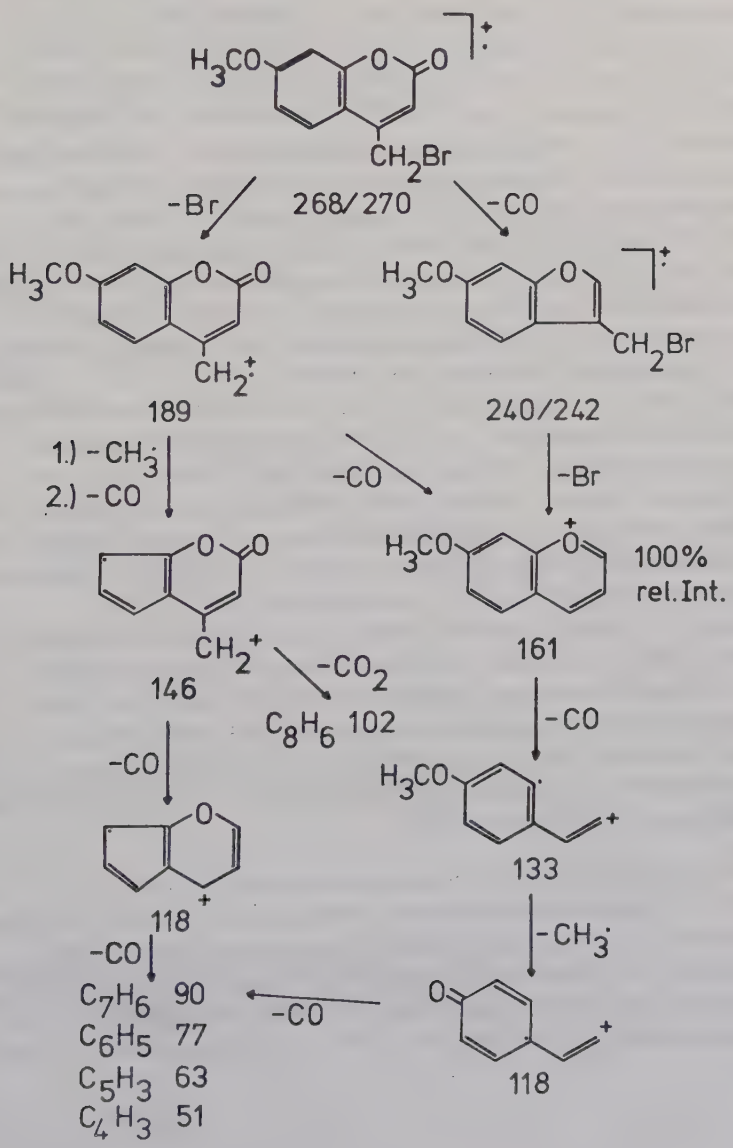
Zur Aufklärung der Fragmentierung des 7-Methoxy-4-methyl-cumarin-Restes kann das Massenspektrum von Br-MMC herangezogen werden (Abb. 18).

Abb. 18: Massenspektrum von 4-Bromomethyl-7-methoxy-cumarin



EI, Direkteinlaß; Ionisierungsenergie: 70 eV;
Ionenquellentemperatur: 200°C; Druck: 10^{-6} - 10^{-7} Torr

Abb. 19: Fragmentierungsschema von 4-Bromomethyl-7-methoxy-cumarin



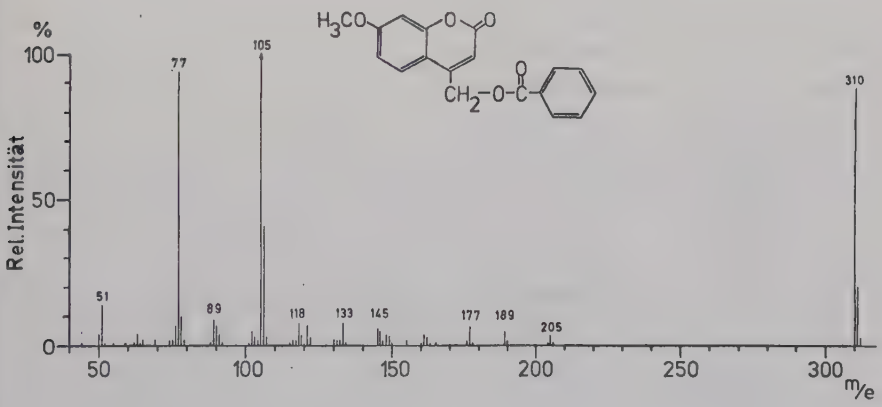
Das Fragmentierungsschema von Br-MMC ist in Abb.19 dargestellt. Das Molekülion $M^{+\cdot}$ mit m/e 268/270 tritt mit einer relativen Intensität von 36 bzw. 35% auf. Als Primärfragmentierung wird hauptsächlich die Bromabspaltung beobachtet, die zum Ion m/e 189 führt. Daneben tritt auch noch die CO-Eliminierung aus dem Molekülion auf, wie das bromhaltige Fragmention bei m/e 240/242 beweist. Das Fragmention m/e 161, der Basispeak des Spektrums mit 100% relativer Intensität, entsteht aus den oben erwähnten Fragmenten entweder durch Bromabspaltung aus m/e 240/242 oder von m/e 189 durch CO-Eliminierung. Von m/e 189 geht auch die zweistufige Fragmentierung aus, die zum Ion m/e 146 führt. Hierbei wird zuerst ein Methylradikal aus der Methoxygruppe und anschließend noch CO eliminiert. Durch weitere CO- bzw. CO_2-Abspaltung entstehen die Fragmentionen mit m/e 118 bzw. 102. Vom Hauptfragmention m/e 161 wird durch CO-Eliminierung über das Fragmention m/e 133 und darauf folgende Abspaltung eines Methylradikals ebenfalls ein Ion mit m/e 118 erhalten. Dieses besitzt jedoch eine andere Struktur als das oben erwähnte. Durch CO-Eliminierung und weitere Fragmentierung werden die im unteren Bereich üblichen Aromatenfragmente mit m/e 90, 77, 63, 51 erhalten.
Die $M^{+\cdot}$ + 1-Peaks bei m/e 269/270 zeigen mit einer relativen Intensität von 6 bzw. 5% höhere Werte als sie durch den ^{13}C-Anteil verursacht werden. Daraus läßt sich auf eine Wasserstoff-Anlagerung am Molekülion schließen (81,82). Das Auftreten von relativ intensiven Fragmentionen mit m/e-Werten 190, 162 und 147 läßt sich durch die Fragmentierung aus dem $M^{+\cdot}$ + 1-Ion erklären.

Die Massenspektren von Benzoesäure-MMC-ester (Abb. 20, Tab. 4) und Stearinsäure-MMC-ester (Abb. 21, Tab. 5) zeigen im Bereich m/e $<$ 170 ähnliche Fragmentionen wie Br-MMC. Die aus den Säureresten stammenden Fragmente bestimmen jedoch bei dem Benzoesäure-MMC-ester das Massenspektrum. Das Fragmention $C_6H_5\text{-}CO^+$ mit m/e 105 ist der Basis-Peak (off scale)

und C_6H_5+ zeigt eine relative Intensität von 94%. Das Molekülion $M^{+\cdot}$ mit m/e 310 tritt mit 89% relativer Intensität auf. Die anderen in Tab. 4 aufgeführten Fragmentionen zeigen relative Intensitäten < 10%. Die oben erwähnte H-Anlagerung wird auch hier beobachtet, der $M^{+\cdot}$ + 1-Peak m/e 311 hat 21% relativer Intensität.

Im Massenspektrum von Stearinsäure-MMC-ester (Abb. 21) ist das 4-Hydroxymethyl-7-methoxy-cumarin-Ion m/e 206 (s. Tab. 5) der intensivste Peak. Dieses Ion kann durch eine Umlagerung mit H-Übertragung oder durch Fragmentierung aus dem $M^{+\cdot}$ + 1-Molekülion entstanden sein.

Abb. 20: Massenspektrum von Benzoesäure-MMC-ester



EI; Direkteinlaß; Ionisierungsenergie: 70 eV;
Ionenquellentemperatur: 170°C, Druck: 10^{-6} - 10^{-7} Torr.

Tab. 4 : Interpretation der wichtigsten Ionen des Massenspektrums von Benzoesäure-MMC-ester

m/e	Interpretation
310	M^{+}
205	$M^{+}-(C_6H_5-CO)$
189	$M^{+}-(C_6H_5-CO_2)$
177	205 - CO
161	205 - CO_2
121	$C_6H_5CO_2^{+}$
105	$C_6H_5CO^{+}$
77	$C_6H_5^{+}$
146)	
133)	Fragmentionen der
118)	Cumaringruppe
89)	

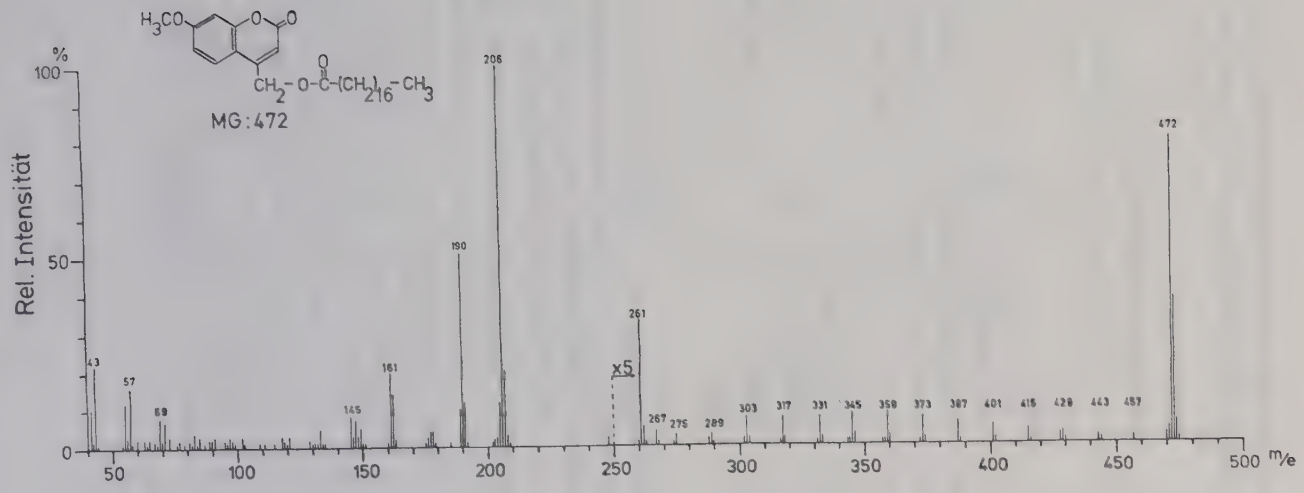


Abb. 21 : Massenspektrum von Stearinsäure-MMC-ester

(EI; Direkteinlaß; Ionisierungsenergie: 70 eV; Ionenquellentemperatur: 150°C; Druck: 10^{-6} - 10^{-7} Torr)

Tab. 5 : Interpretation der wichtigsten Ionen im Massenspektrum von Stearinsäure-MMC-ester

m/e	Interpretation
471	M^{+}
457	$M^{+}-CH_3$
443,429,415,401,)	$(M^{+} - CH_3) - n \cdot CH_2$;
387,373,359,345,)	oder $MMC(CO_2nCH_2)^{+}$
331,317,303,289,)	wobei n = 1,2,3,...,14
275,261)	
267	$CH_3(CH_2)_{16}CO^{+}$
248	$MMC(CO_2CH_3)^{+}$
206	$MMCOH^{+}$
190	MMC^{+}
178	206 - CO
162	206 - CO_2
147,145,133,)	Fragmente des
118,102,91)	MMC's

Die Ionen m/e 248, 190, 178 und 162 (Tab. 5) sind bei Reaktionen nach denselben Mechanismen wie das Ion m/e 206 entstanden. Im oberen Bereich des Spektrums m/e > 261 treten die Fragmentionen mit m/e-Differenzen von 14 auf. Sie sind auf die Fragmentierung des Stearinsäurerestes zurückzuführen. Ihre Intensitätsverteilung entspricht der, die bei der Fragmentierung der freien Säure auftritt. Die relative Intensität dieser Fragmentation liegt unter 2%. Das Molekülion m/e 472 zeigt eine relative Intensität von 16%

und ist damit der stärkste Peak im oberen Massenbereich. Das Ion m/e 267 ist auf den Säurerest zurückzuführen (s. Tab. 5).

Tab. 6 : Massenspektrometrische Daten der MMC-Ester

MMC-Ester von	Molekülion M^+ m/e	% rel.Int.	Basepeak m/e	Säurerest	m/e	% rel.Int.
Essigsäure	248	50	206	CH_3-CO	43	41
Benzoesäure	310	18	105	C_6H_5-CO	105	100
Phenylessigsäure	324	52	91	$C_7H_7^+$	91	100
Caprinsäure	360	11	206	CH_3-$(CH_2)_8$-CO	155	4
Myristinsäure	416	11	206	CH_3-$(CH_2)_{12}$-CO	211	2
Linolsäure	468	12	206/190	$C_{18}H_{31}O$	263	0,6
Stearinsäure	472	16	206	CH_3-$(CH_2)_{16}$-CO	267	1

Die wichtigsten Daten der massenspektrometrisch untersuchten MMC-Ester sind in Tab. 6 aufgeführt. Den Basepeak der Spektren aller MMC-Ester der aliphatischen Säuren ergibt das Fragmention m/e 206.

Alle diese Säuren besitzen eine zur Carboxylfunktion benachbarte $-CH_2-$ bzw. $-CH_3$-Gruppe. Daher kann bei ihnen das Ion m/e 206 durch Wasserstoff-Umlagerung und gleichzeitiger Abspaltung des Säurerestes R-CO entstehen. Bei Phenylessigsäure tritt im Gegensatz zu Benzoesäure ebenfalls das Ion m/e 206 auf. Dies unterstützt den oben beschriebenen Mechanismus. Der Säurerest tritt meist mit Ionen der Struktur R-CO in den Spektren auf. Nur im Massenspektrum von Phenylessigsäure-MMC-ester wird das aus der Säure stammende, sehr stabile Tropyliumkation $C_7H_7^+$ m/e 91 beobachtet.

4.2.4. NMR-Spektren

Aus den ^{13}C-NMR-Spektren der dargestellten Cumarinderivate können weitere Strukturdaten gewonnen werden. Bei der Signalzuordnung der Cumarinderivate wird auf die Arbeit von Günther et al (83) über das Cumarin und 7-Methoxy-cumarin zurückgegriffen. Rechnungen von Grigor et al (84) bestätigten die getroffenen Einzelzuordnungen.

Das ^{13}C-Spektrum von 7-Methoxy-cumarin-essigsäure-4 (Abb. 22; Tab. 7) zeigt drei charakteristische Verschiebungsbereiche, den aliphatischen, den aromatischen sowie den der Carbonyl-Resonanzen. Die Signale der Methylen- (C-12, Abb. 22) und Methoxygruppierung (C-11, Abb. 22) sind im aliphatischen Bereich bei hohem Feld neben den Lösungsmittelresonanzen (DMSO) leicht zuzuordnen. Die Signalzuordnung der aromatischen Resonanzen erfolgt analog zu den Literaturdaten, sowie durch das off-resonance-Spektrum. Das Signal von C-8 wird durch den o-Effekt der 7-Methoxy-Gruppe und den Einfluß des Lactonrings stark hochfeldverschoben. Die C-5-Resonanz erfährt bei der 7-Methoxy-cumarin -4-essigsäure bzw. 7-Methoxy-4-hydroxy-methyl-cumarin im Vergleich zu 7-Methoxy-cumarin eine schwächere Hochfeldverschiebung von 1,9 bzw. 3,2 ppm, die auf den sterischen Effekt der Gruppierungen in 4-Stellung zurückzuführen ist. Die in γ-Stellung zu H-5 stehende CH_2-Gruppe bewirkt durch eine peri-Wechselwirkung diese spezifische Hochfeldverschiebung. Die sehr eng beeinander liegenden Resonanzen von C-3, C-6 und C-9 können durch off-resonance- und Vergleichsmessungen zugeordnet werden.

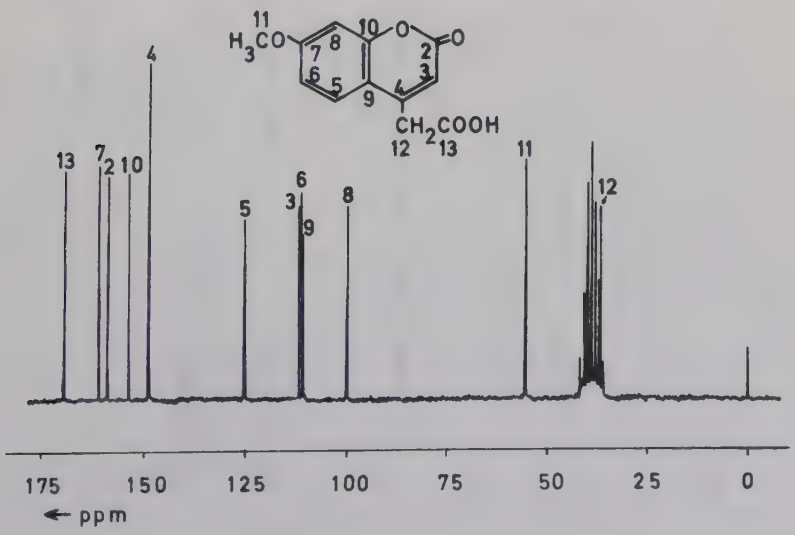
Die an Sauerstoff gebundenen Cumarin-Kohlenstoffe C-7 und C-10 liegen neben den Carbonyl-Resonanzen von C-2 und C-13 bei niedrigem Feld. Die Resonanz der Carboxylgruppe zeigt das am stärksten tieffeldverschobene Signal. Das Signal des olefinischen C_4, das durch die Gruppe CH_2-COOH tieffeld-verschoben wird (Tab. 7), erscheint in diesem Bereich bei

höchstem Feld. Durch saure Hydrolyse der MMC-Ester entsteht das 7-Methoxy-4-hydroxymethyl-cumarin. Diese Verbindung zeigt ein Signal bei 59,0 ppm, das der CH_2-OH-Gruppe zugeordnet wird. Die gefundene Konstitutionsabhängigkeit der Verschiebungen (γ-Effekt) bestätigt in eindrucksvoller Weise die Konstitution der dargestellten Cumarinderivate.

Anhand der ^{13}C-Spektren der Cumarine lassen sich Einflüsse wie Ladungsdichte und spezifische Polarisierbarkeiten auf die ^{13}C-Verschiebung untersuchen. Die Spektren sind daher auch von starken theoretischem Interesse.

Die Protonenresonanzen des Cumarinsystems treten im aromatischen Bereich auf (Tab. 8) (74). Das Signal der Methoxy-Protonen wird bei allen MMC-Estern bei 3,88 ppm beobachtet. Bei den aliphatischen MMC-Estern liegt das Signal der 4-Methylen-Gruppe bei gleichem Feld (5,25/5,27 ppm), während es bei Benzoesäure-MMC-ester um 0,2 ppm tieffeldverschoben ist (Tab. 8). Die Resonanzen der Protonen des Säurerestes stimmen mit den Literaturdaten überein (85).

Abb. 22: ^{13}C-Spektrum von 7-Methoxy-cumarin-essigsäure-4



Tab. 7: ^{13}C-Verschiebungen verschiedener Cumarinderivate in ppm

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	Lösungsmittel
7-Methoxy-cumarin *	160,4	113,1	142,9	128,5	112,4	162,7	100,7	115,9	112,4	(a)	-	-	$CCl_4/CDCl_3$ 3/2
7-Methoxy-cumarin-essigsäure-4	160,2	113,0	150,1	126,6	112,5	162,5	100,9	155,1	112,3	55,9	37,3	170,8	DMSO-d_6
7-Methoxy-cumarin-hydroxy-methyl-4	160,3	107,4	156,5	125,3	111,9	162,1	100,7	154,7	110,6	55,8	59,0	-	DMSO-d_6

* vgl. Lit. (83)

(a) keine Angabe

Tab. 8: 90 MHz-Protonenspektren der MMC-Ester

	Zuordnung	ppm	Signal	(Anzahl)
7-Methoxy-	$-OCH_3$	3,88	s	(3)
cumarin-	H_3	6,21-6,34	t	(1)
Gruppierung	$H_{6,8}$	6,8-6,93	m	(2)
	H_5	7,29-7,47	m	(1)
Säurerest:				
Essigsäure	CH_3	2,21	s	(3)
	$-CH_2-O$	5,26/5,27	d	(2)
Benzoesäure	$-CH_2-O$	5,49/5,51	d	(2)
Ø	$-H_{3,4,5}$	7,44-7,64	m	(3)
Ø	$-H_{2,6}$	8,06-8,16	q	(2)
Caprinsäure	$-CH_2-O-$	5,25/5,27	d	(2)
Myristinsäure	$\alpha-CH_2$	2,36-2,53	t	(2)
Stearinsäure	$\beta-CH_2$	1,41	breites t	(2)
	$\gamma-(CH_2)_x$	1,26	s	(2x)
	$-CH_3$	0,88	breites t	(3)

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Naphthalin-Derivate

Essigsäure-1-methyl-naphthalinester (86)

17,6 g (0,1 Mol) 1-Chlormethylnaphthalin werden mit 8,2 g (0,15 Mol) wasserfreiem Natriumacetat in 45 ml Eisessig 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt (86). Die Reaktionsmischung wird in 50 ml Benzol aufgenommen und mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt. Die getrocknete benzolische Lösung wird im Vakuum bis zum Öl eingeengt, das anschließend über eine 25 cm Vigreux-Kolonne im Vakuum (0,4 Torr) in drei Fraktionen getrennt wird. Fraktion III ($Kp_{0,4}$ 115-118°C) enthält 11,5 g (≙ 57% d.Th.) des Essigsäure-1-methyl-naphthylesters. Lit.: $Kp_{1,5}$ 134-136°C.

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 200

15,08 MHz ^{13}C-Spektrum:

CH_3	20,23 ppm
CH_2	63,88 ppm
Aromat.C	123,14 - 133,34 ppm
C=O	170,19 ppm

α-Naphthylacetylester (87)

Die Darstellung erfolgt nach der Arbeitsvorschrift von Spassow (87). Nach Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther (60/90) 2/1 erhält man 10 g (≙ 54,1% d.Th.) α-Naphthylacetylester, der weiß kristallin anfällt.
Fp.: 46-47°C; Lit.: Fp.: 46-47°C.

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 186

15,08 MHz ^{13}C-Spektrum:

CH_3	20,35 ppm
Aromat.C	117,73 - 134,31 ppm
C_1	146,39 ppm
CO	168,98 ppm

α-Naphthylacetamid (88)

Die Reaktion wird entsprechend einer allgemeinen Vorschrift zur Amiddarstellung durchgeführt (88). Zu einer Mischung von 11 ml (0,15 Mol) Acetylchlorid und 20 ml getrocknetem Pyridin in 100 ml Toluol werden 14,3 g (0,1 Mol) α-Naphthylamin, gelöst in 75 ml Toluol, unter Rühren zugetropft. Anschließend wird die Reaktionsmischung noch 1 Stunde bei 100°C gerührt. Die erkaltete Reaktionslösung wird mit 100 ml Wasser versetzt und mit Äther extrahiert. Die getrocknete Ätherlösung wird bis zur Trockene eingeengt. Nach Umkristallisieren des festen Rückstands aus Essigester erhält man weiße Kristalle (Fp.: 120-140°C).
Durch eine Säulentrennung an Kieselgel mit Benzol und Benzol/Essigester 1/1 kann neben α-Naphthylacetamid(I) (Fp.: 159°C) noch α-Naphthylamindiacetat(II) (Fp.: 128,5°C) isoliert werden.
Lit.: I) Fp.: 159,7°C; II) Fp.: 129°C (89).

70 eV-Massenspektren: I m/e:M^+ 185; 143; 117
II m/e:M^+ 227; 185; 143; 117

90 MHz-Protonenspektren:

I	CH_3	2,2 ppm s	Aromat.H	7,4 - 8,1 ppm m	NH	9,9 s
II	CH_3	2,2 ppm s	Aromat.H	7,3 - 7,9 ppm m		

Chlormethylierung von 1-Methoxy-naphthalin

Trockener Chlorwasserstoff wird durch eine eiskalte Suspension von 12,6 g Paraformaldehyd in 175 ml Eisessig geleitet bis man eine klare Lösung erhält. 28,7 ml (0,2 Mol) 1-Methoxy-naphthalin in 280 ml Eisessig werden unter Rühren bei 0° C zugetropft (90). Nach Beendigung der Zugabe fällt nach 1 Stunde bei Raumtemperatur ein feiner, weißer Niederschlag aus. Dieser wird aus Benzol/Petroläther 60/90 (1/2 v/v) umkristallisiert.

12,6 g Di(4-Methoxy-naphthyl-1)methan $C_{23}H_{20}O_2$

Fp.: 148 - 149° C.

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 328

Analyse: $C_{23}H_{20}O_2$

Ber.: C 84,12 H 6,14
Gef.: C 85,01 H 6,17

1-Methyl-naphthyl-kaliumsulfonat-4 (67,68)

1 Mol 1-Methylnaphthalin wird nach der Vorschrift von Steiger (86) mit Chlorsulfonsäure umgesetzt. Nach der Neutralisation und Umkristallisieren aus Wasser erhält man 196 g (≙ 75% d.Th.) 1-Methylnaphthyl-kalium-sulfonat-(4).

1-Methyl-naphthol-4 (67,68)

Zu einer Alkalischmelze (20 g Wasser + 100 g Kaliumhydroxid) im Eisentiegel werden unter Rühren in kleinen Portionen 40 g (0,15 Mol) 1-Methyl-naphthyl-kaliumsulfonat-4 gegeben, während die Temperatur der Schmelze von 220°C auf 260°C gesteigert wird (67,68). Die Temperatur der schäumenden Schmelze wird dann für 5 min bei 280°C gehalten, wobei sich eine zähflüssige braune Masse abscheidet. Zum Abkühlen wird die Mischung auf eine Glasplatte gegossen, anschließend in Wasser gelöst, mit konzentrierter Salzsäure angesäurert und mit Äther extrahiert. Die getrocknete Ätherlösung wird mit Aktivkohle behandelt und nach dem Filtrieren eingeengt. Der Rückstand wird aus Petroläther 60/90 unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert. Beim Auskristallisieren fällt neben farblosen Kristallen auch ein rotes Öl an, das abgetrennt wird. Ausbeute: 12,7 g ≙ 55% d.Th..

Fp.: 84°C; Lit.: Fp.: 83-85°C.

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 158

90-MHz-Protonenspektrum: CH_3 2,6 ppm s3
OH 5,12 ppm s 1
Aromat.H 2,3 ppm 6,65 - 7.23 m 2
6,7 ppm 7,40 - 7,64 m 2
5,8 ppm 7,85 - 8,03 m 1;
8,11 - 8,28 m 1

Analyse: $C_{11}H_{10}O$

Ber.: C 83,54 H 6,32
Gef.: C 83,72 H 6,49

4-Methoxy-1-methylnaphthalin (92)

1-Methyl-naphthol-4 wird mit Dimethylsulfat methyliert (91).

Ansatz: 0,1 Mol 1-Methyl-naphthol-4
Ausbeute: 15,3 g (≙ 80% d.Th.) 4-Methoxy-1-methylnaphthalin

$Kp_{0,8}$: 121°C; Lit.: Kp_{21}: 164-165° C (92)

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 172

90 MHz-Protonenspektrum: CH_3 2,59 ppm s 3
OCH_3 3,94 ppm s 3
Aromat.H 2,3 ppm 6,63 - 7,23 m 2
6,7 ppm 7,44 - 7,60 m 2
5,8 ppm 7,85 - 7,96 m 1
ppm 8,23 - 8,34 m 1

Analyse: $C_{12}H_{12}O$

Ber.: C 83,7 H 7,0
Gef.: C 83,6 H 7,1

Bromierung von 4-Methoxy-1-methylnaphthalin

Eine Suspension von 5,4 g (0,03 Mol) N-Bromsuccinimid in einer Lösung von 5,2 g (0,03 Mol) 4-Methoxy-1-methylnaphthalin in Tetrachlorkohlenstoff wird mit 0,1 g Azoisobutyronitril versetzt und der Reaktionsansatz unter Rühren 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Nach Abtrennen des ausgefallenen Succinimids wird die Lösung mit 40 ml eiskalter verdünnter Natronlauge ausgeschüttelt. Die getrocknete Lösung wird bis zum Öl eingeengt, das nach längerem Stehen bei 4°C auskristallisiert. Nach Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther 60/90 (1/1, v/v) erhält man 5,3 g (≙ 70% d.Th.) rötlich kristallines 3-Bromo-4-methoxy-1-methylnaphthalin.

Fp.: 49° C.

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 250/252

90 MHz-Protonenspektrum: CH_3 2,61 ppm s 3
OCH_3 3,98 ppm s 3
Aromat. H 2 ppm 7,24 - 7,43 m 1
6,7 ppm 7,47 - 7,63 m 2
5,8 ppm 7,87 - 7,99 m 1
ppm 8,03 - 8,24 m 1

Analyse: $C_{12}H_{11}BrO$:

Ber.: C 57,39 H 4,41 Br 31,74
Gef.: C 57,48 H 4,49 Br 31,59

4-Nitro-1-methylnaphthalin (69)

Die Nitrierung von 1-Methylnaphthalin wird nach Thompson (69) durchgeführt. Das 4-Nitro-Isomere wird durch Ausfrieren und Umkristallisieren aus Äthanol gereinigt.

Ansatz: 71 g (0,5 Mol) 1-Methylnaphthalin
Ausbeute: 47 g (≙ 50% d.Th.) gelbes, kristallines, 4-Nitro-1-Methylnaphthalin.

Fp.: 71°C; Lit.: Fp.: 71-72°C

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 187

15,08 MHz ^{13}C-Spektrum: CH_3 20,03 ppm

Analyse: $C_{11}H_9O_2N$

Ber.: C 70,59 H 4,81 N 7,49
Gef.: C 70,70 H 4,93 N 7,50

4-Amino-1-methylnaphthalin (70)

4-Nitro-1-methylnaphthalin wird nach der Vorschrift von Balcom und Furst (93) reduziert. Zu einer Lösung von 36,7 g (0,2 Mol) 4-Nitro-1-methylnaphthalin und 45 ml Hydrazinhydrat (4-5-facher Überschuß) in 500 ml Äthanol wird unter

Rühren Raney-Nickel (13 g Legierung) in kleinen Portionen zugegeben. Anschließend rührt man weitere 2 Stunden bei 40°C und erhitzt dann noch 2 Stunden unter Rückfluß. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird die Lösung zum Öl eingeengt. Das Öl wird in Äther aufgenommen und das Hydrochlorid des Amins wird mit Chlorwasserstoff aus ätherischer Lösung gefällt. Nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser 75/25 (v/v) erhält man 26 g (≙ 67% d.Th.) weiße Nadeln des 4-Amino-1-methyl-naphthalin-hydrochlorid.

Fp.: 233°C; Lit.: Fp.: 233-234°C

4-Amino-1-methyl-naphthalin:
70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 157

4-N,N-Dimethylamino-1-methylnaphthalin

20 g (0,13 Mol) 4-Amino-1-methylnaphthalin werden mit Dimethylsulfat methyliert (94). Der Reaktionsansatz wird mit Natronlauge auf pH 12 eingestellt und einer Wasserdampfdestillations unterworfen. Das erhaltene Destillat (ca. 300 ml) wird mit Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels fällt das 4-N,N-Dimethylamino-1-methylnaphthalin als Öl an (23 g ≙ 95% d.Th.).

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 185

90 MHz-Protonenspektrum: CH_3 2,61 ppm s 3
$N(CH_3)_2$ 2,87 ppm s 6
Aromat.H 2,3 ppm 6,94 - 7,26 m 2
6,7 ppm 7,44 - 7,59 m 2
5,8 ppm 7,9 - 8,01 m 1;
8,27 - 8,38 m 1

Analyse: $C_{13}H_{15}N$

Ber.:	C	84,28	H	8,16	N 7,56
Gef.:	C	84,43	H	8,28	N 7,45

Bromierung von 4-N,N-Dimethylamino-1-methylnaphthalin

22,2 g (0,125 Mol) N-Bromsuccinimid werden in einer Lösung von 23 g (0,125 Mol) 4-N,N-Dimethylamino-1-methylnaphthalin in 125 ml trockenem Tetrachlorkohlenstoff suspendiert und anschließend mit 0,25 g Azoisobutyronitril versetzt. Der Reaktionsansatz wird vorsichtig zum Sieden gebracht und so lange am Rückfluß erhitzt, bis sich alles N-Bromsuccinimid umgesetzt hat. Die erkaltete Lösung wird vom Niederschlag befreit und bis zu einem Öl eingeengt. Dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, 20 x 20 cm) werden 500 mg des entstandenen Öls mit Benzol aufgetrennt. Unter der UV-Lampe (254 nm) werden drei Flecken mit R_f: 0,28; 0,4; 0,63 beobachtet. 3-Bromo-4-N,N-dimethylamino-1-methyl-naphthalin mit R_f 0,63 wird vom ausgekratzten Kieselgel auf einer Glasfritte mit Aceton eluiert. Die Ausgangssubstanz zeigt einen R_f-Wert von 0,28. Für die Substanz mit R_f 0,4 beobachtet man im Massenspektrum ein Molekülion bei m/e 360/362 mit einem Bromatom.

3-Bromo-4-N,N-Dimethylamino-1-methylnaphthalin:

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 263/265

90 MHz-Protonenspektrum: CH_3 2,68 ppm s 3
$N(CH_3)_2$ 3,00 ppm s 6
Aromat.H 2 ppm 7,25 - 7,41 d 1
6,7 ppm 7,42 - 7,61 m 2
5,8 ppm 7,82 - 7,97 m 1;
8,25 - 8,4 m 1

Analyse: $C_{13}H_{14}BrN$

Ber.:	C	59,11	H	5,34	Br	30,25	N 5,30
Gef.:	C	59,23	H	5,50	Br	29,78	N 5,39

5.2. MMC-Ester

a) 7-Methoxy-cumarin-4-essigsäure (95)

7-Methoxy-cumarin-4-Essigsäure wurde in Analogie zur Vorschrift von W. Baker et.al. (95) dargestellt. 50 g feingepulverte Zitronensäure (0,25 Mol) werden mit 70 ml konz. H_2SO_4 bis zum Abklingen der starken Gasentwicklung gerührt. Anschließend wird langsam unter Rühren bis auf 70°C erwärmt und die Reaktionsmischung bis zur Beendigung der Gasentwicklung auf dieser Temperatur gehalten. Dann wird auf -5°C abgekühlt und innerhalb 30 Minuten 22,5 g (0,2 Mol) Resorcinmonomethyläther so zugegeben, daß 5°C nicht überschritten werden. Bei der sich anschließenden Zugabe von 29 ml konz. H_2SO_4 soll die Temperatur diesen Wert ebenfalls nicht überschreiten. Die Reaktionsmischung wird dann noch 1 Stunde bei 0° C gerührt und danach auf 100 ml Eis gegossen. Dabei fällt ein feiner, gelblicher Niederschlag aus, der abgesaugt wird. Das feuchte Produkt wird über KOH und P_4O_{10} getrocknet. Umkristallisiert wurde aus ca. 250 ml Äthanol.

Ausbeute: 33,2 g ≙ 71% d.Th.

Fp.: 187°C; Lit.: Fp.: 186-187°C

70 eV-Massenspektrum: Molekülion m/e 262, entspricht dem Äthylester, der beim Umkristallisieren gebildet wurde.

Analyse: $C_{12}H_{10}O_5$

Ber.:	C	61,64	H	4,3
Gef.:	C	61,79	H	4,43

b) 4-Bromomethyl-7-methoxy-cumarin (74)

Br-MMC wurde der Arbeitsvorschrift von Secrist et.al. (74) folgend dargestellt. Das erhaltene gelbe Produkt wurde noch aus Äthanol (1,5 l für 7 g) umkristallisiert.

Ansatz: 15,7 g 7-Methoxy-cumarin-benzoesäure (60 mM)
9,6 g Brom (60 mM)
90 ml Eisessig
Ausbeute: 6,3 g ≙ 39% d.Th.

Fp.: 208°C; Lit.: Fp.: 208-209°C

Analyse: $C_{11}H_9BrO_3$

Ber.:	C	49,1	H	3,39	Br 29,64
Gef.:	C	49,1	H	3,37	Br 29,69

c) MMC-Ester

Reaktion für analytische Zwecke:
100 ml einer 10^{-2} molaren bzw. 500 ml einer 2.10^{-3} molaren Lösung der Säuren (je 10^{-6} Mol) in Aceton werden mit 600 ml einer 5.10^{-3} molaren Lösung von Br-MMC in Aceton (3.10^{-6} Mol) versetzt und zusammen mit einer Spatelspitze K_2CO_3 eine Stunde unter Lichtausschluß am Rückfluß erhitzt (29). Nach Beendigung der Reaktion wird das feste überschüssige K_2CO_3 abgetrennt.
Bei der HPLC-Analyse wurden meist 10 µl Lösung, die 10^{-8} - 10^{-10} Mol der MMC-Ester enthielt, eingespritzt.

Präparative Darstellung einiger MMC-Ester:
6 mM der Säure wurden zusammen mit 5 mM Br-MMC und ca. 3 g feingepulvertem K_2CO_3 eineinhalb Stunden unter Lichtausschluß am Rückfluß gekocht. Die überschüssige Säure wird nach Beendigung der Reaktion zusammen mit festem K_2CO_3 als Kaliumsalz abgetrennt. Die acetonische Lösung wird im Vakuum zur Trockne einrotiert und der Niederschlag aus Äthanol (ca. 200-300 ml) umkristallisiert.

Tab. 9: Analysen einiger MMC-Ester

MMC-Ester von	Fp. °C	Summenformel	C ber.	C gef.	H ber.	H gef.
Essigsäure	162-164	$C_{13}H_{12}O_5$	62,9	63,0	4,87	4,93
Benzoesäure	150-152	$C_{18}H_{14}O_5$	69,67	69,78	4,55	4,58
Caprinsäure	73,5-74,5	$C_{21}H_{28}O_5$	69,97	69,82	7,83	8,05
Myristinsäure	83-84	$C_{25}H_{36}O_5$	72,08	72,27	8,71	8,81
Linolsäure	34-35	$C_{29}H_{40}O_5$	74,33	73,78	8,6	8,79
Stearinsäure	91-92	$C_{29}H_{44}O_5$	73,69	72,9	9,38	9,62

d) Fettsäuren aus natürlichen Fetten

Hydrolyse der Fette:
Die Fette werden in destilliertem Petroläther 60/90 aufgenommen und die Lösung mit Natriumsulfat getrocknet. Der Petroläther wird im Vakuum abrotiert und der Rückstand mit 100 ml methanolischer 1N Natronlauge 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird Methanol abgedampft und die Natriumsalze der Fettsäuren mit NaCl ausgesalzen. Der abgesaugte Niederschlag wird in Wasser aufgenommen und die mit Salzsäure freigesetzten Fettsäuren mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wird über Na_2SO_4 getrocknet und anschliessend das Lösungsmittel im Vakuum abrotiert. Der Rückstand wird in 100 ml getrocknetem Äther aufgenommen.

Ausgelassenes Entenfett: 7 g

freie Fettsäuren: 4,64 g in 100 ml Äther
46,4 mg werden in 25 ml Aceton gelöst.
Derivatisierung:
200 µl der acetonischen Lösung $\hat{=}$ $3,7.10^{-4}$ g der freien Fettsäuren.

HPLC-Analyse:
$3{,}7.10^{-8}$ g in 10 µl Methanol bezogen auf die freien Fettsäuren.

Sonnenblumenöl: 14 g

freie Fettsäuren: 10,1 g in 100 ml Äther
50 mg werden in 25 ml Aceton gelöst.
Derivatisierung:
200 µl der acetonischen Lösung ≙ 4.10^{-4} g der freien Fettsäuren.
HPLC-Analyse:
4.10^{-8} g in 10 µl Methanol bezogen auf die freien Fettsäuren.

5.3. HPLC

Säulenfüllung:
Die Trennsäule (Stahl, 250 mm x 4,6 mm) wird mit einer Mischung Dioxan/Tetrabromäthan (1/1, v/v) gefüllt. In die Vorsäule wird dann eine mit Ultraschall hergestellte Suspension von 4 g LiChrosorb in 20 ml der Dioxan/Tetrabromäthan-Mischung eingebracht und mit Isooktan überschichtet. In Analogie zu den Literaturvorschriften (96,97) wird dann durch Pumpen von Dioxan (70 ml) mit maximal erreichbarem Druck das Säulenmaterial in die Trennsäule gepreßt. Nach Dioxan wird noch mit 600 ml Methanol (2,6 ml/min) gespült. Die Vorsäule wird entfernt und die Trennsäule auf die Trennbedingungen konditioniert.

Die Zahl der theoretischen Boden der hergestellten Säule werden für Myristinsäure-MMC-ester (Isokratische Elution: Methanol/Wasser 95:5; 1 ml/min mit t_r=354 sec; $W_{0,5}$=15 sec nach Formel (7) berechnet. Für die 25 cm RP8-Säule ergeben sich 3100 theoretische Böden.

Bei allen Trennungen wurde mit einem Papiervorschub von 1 cm/min bearbeitet.

DURCHFÜHRUNG DER SPEKTROSKOPISCHEN BESTIMMUNGEN UND ANALYSEN

Die Massenspektren wurden von Herrn Bartholomä mit einem Massenspektrometer MAT 711 der Firma Varian, Bremen, aufgenommen.

Elementaranalysen führte Herr Wurmstich an einem Carlo Erba Elemental Analyzer Mod. 1104 durch.

NMR-Spektren wurden von den Herren Dr. Albert und Dr. Lange an den Geräten HFX 90 und WP 60 der Firma Bruker-Physik AG, Karlsruhe, gemessen.

Den Herren sei an dieser Stelle für ihre Mühe gedankt.

6. GERÄTE UND LÖSUNGSMITTEL

HPLC-Gerät:
Orlita-Pumpen DMP-SK 15/3)
Programmgeber M 660) Fa. Waters, Königstein
Einspritzventil U 6 K)

Fluoreszenzdetektoren:
Kontrom Spectralfluorometer SFM 22
Aminco Fluoro-Colorimeter

Säulen:
Fertigsäule LiChrosorb RP8 (7 µm) 25 cm x 31 mm,
Merck, Darmstadt
V 4 A-Stahlsäule 25 cm x 4,6 mm,
Knauer, Oberursel

Säulenfüllung:
LiChrosorb RP8 (5 µm), Merck, Darmstadt

Lösungsmittel:
Methanol Uvasol für die Spektroskopie)
Aceton Uvasol für die Spektroskopie) Merck, Darmstadt

7. DISKUSSION

Da die Verbindungen der substituierten Naphthaline mit Carbonsäuren nur schwach fluoreszieren und sich bei den mit fluoreszenzverstärkenden substituierten Naphthalinen keine reaktive Halogenmethylgruppierung einführen läßt, sind diese Verbindungen nicht für die Fluoreszenzmarkierung geeignet.

Mit den 4-Methyl-7-methoxy-cumarin-estern stehen jedoch stark fluoreszierende Carbonsäurederivate zur Verfügung. Bei geeigneter Probenaufarbeitung können auch sehr geringe Substanzmengen, die besonders bei Untersuchungen von biologischen Material anfallen, leicht in diese Derivate überführt werden. Die hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion in Verbindung mit HPLC erschließt daher Bereiche, die mit den bisher üblichen Methoden, wie Gaschromatographie, HPLC mit UV-Detektion, oder DC mit Fluoreszenzdetektion, nicht zugänglich waren.
Da die Fluoreszenz bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen wird, ist die Fluoreszenzdetektion sehr spezifisch. Daher ergeben sich auch hier Vorteile für die Fluoreszenzdetektion gegenüber den meist unspezifischen Detektionsmöglichkeiten der GC und den weniger spezifischen bei der UV-Detektion.

Besonders bei empfindlichen, z.B. ungesättigten Fettsäuren, wie sie in manchen biologischen Proben vorkommen, kann diese Methode wegen ihrer Selektivität, Schnelligkeit, Trennwirksamkeit, hohen Empfindlichkeit sowie den schonenden Temperaturbedingungen von großer Bedeutung werden.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die Reaktion von Essigsäure mit 1-Hydroxy-, 1-Amino- und 1-Chlormethylnaphthalin ergibt schwach fluoreszierende Verbindungen. Die in 4-Stellung mit fluoreszenzverstärkenden Substituenten, den Methoxy- und N,N-Dimethylamino-Gruppen, versehenen 1-Methyl-naphthaline lassen sich durch die beschriebenen Reaktionen nicht in der Seitenkette, sondern nur im Kern bromieren. Es werden daher auf diesem Weg mit Carbonsäuren keine fluoreszierenden Ester erhalten.

Durch die Umsetzung von Carbonsäuren mit 4-Bromomethyl-7-methoxy-cumarin in Gegenwart von Kaliumcarbonat werden sehr stark fluoreszierende Carbonsäureester erhalten. Diese 4-Methyl-7-methoxy-cumarin-ester konnten mit Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie eindeutig charakterisiert werden.
Die Trennung von Fettsäuregemischen (gesättigte C_6- bis C_{22}- und ungesättigte C_{18}-Säuren), die in die 4-Methyl-7-methoxy-cumarin-ester übergeführt wurden, konnten mit Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie an Reversed-Phase-Säulen (RP 8, 250 mm x 4,6 mm) mit einem Methanol-Wasser-Gradienten erreicht und durch Fluoreszenzdetektion (Anregung 325 nm, Emission 410 nm) nachgewiesen werden. Unter den gleichen Trennbedingungen konnten die Fettsäuregemische natürlicher Fette, wie Entenfett und Sonnenblumenöl, untersucht werden. Die Trennungen lassen sich in sehr kurzer Zeit (25 min) durchführen. Bis zu 10^{-16} Mol von Myristinsäure-4-methyl-7-methoxy-cumarin-ester konnten mit dieser Methode erfaßt werden.

Es steht somit eine sehr schnelle und empfindliche Methode für Fettsäureuntersuchungen zur Verfügung, die die bisher üblichen Methoden bei Untersuchungen von biologischem Material ersetzen kann.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1) Gunstone, An Introduction to the Chemistry of Fatty Acids and their Glycerides, Chapman and Hall, London 1968
2) M.S.F. Ross, J.Chromatogr. 141, 107 (1977)
3) J. Churáček, F. Kopenčny, M. Kulhavý u. M. Jureček, Z.Anal.Chem. 208, 102 (1965)
4) J. Churáček, J.Chromatogr. 48, 241 (1970)
5) J. Churáček u. H. Pechová, ibid 48, 250 (1970)
6) R.M. Ikeda, A.D. Webb u. R.E. Kempner, Anal.Chem. 26, 1228 (1954)
7) A. Grünert u. K.H. Bassler, Z.Anal.Chem. 267, 342 (1973)
8) U. Hintze, H. Röper u. G. Gercken, J.Chromatogr. 87, 481 (1973)
9) H. Ehrsson, Acta Pharm.Suecica 8, 113 (1971)
10) F. Mikeš, V. Schurig u. E. Gil-Av, J.Chromatogr. 83, 91 (1973)
11) I.R. Politzer, G.W. Griffin, B.J. Dowley u. J.L. Laseter , Anal.Lett. 6, 539 (1973)
12) Regis Lab. Notes, No. 16, Regis, Norton Growe III, 1974
13) D.R. Knapp u. S. Krueger, Anal.Lett. 8, 603 (1975)
14) R.F. Borch, Anal.Chem. 47, 1417 (1975)
15) T.J. Roseman, S.S. Butler u. S.L. Douglas, J.Pharm.Sci. 65, 673 (1976)
16) H.D. Durst, M. Milano, E.J. Kikta, S.A. Connelly u. E. Grushka, 47, 1797 (1975)
17) W. Morozowich u. S.L. Douglas, Prostaglandins 10, 19 (1975)
18) E. Grushka, H.D. Durst u. E.J. Kikta, J.Chromatogr. 112, 673 (1975)
19) M.J. Cooper u. M.W. Anders, Anal.Chem. 46, 1849 (1974)
20) B. Kaltenegger, Dissertation Tübingen 1977

21) N.E. Newton, K. Ohno u. M.M. Abdel-Monem, J.Chromtogr. 124, 277 (1976)
22) G. Schwedt u. H.H. Bossemas, Chromatographia 9, 17 (1976)
23) R.M. Cassidy, D.S. Le Gay u. R.W. Frei, J.Chromatogr.Sci. 12, 85 (1974)
24) R.W. Frei, W. Santi u. M. Thomas, J.Chromatogr. 116, 365 (1976)
25) E. Bayer, E. Grom, B. Kaltenegger u. R. Uhmann, Anal.Chem. 48, 1106 (1976)
26) R.W. Frei u. J.F. Lawrence, J.Chromatogr. 83, 321 (1973)
27) H.P. Thier, Angew.Chem. 86, 224 (1974)
28) W. Dünges, Chromatographia 9, 624 (1976)
29) W. Dünges, Anal.Chem. 49, 442 (1977)
30) W. Dünges, A. Meyer, K.-E. Müller, M. Müller, R. Pietschmann, C. Plachetta, R. Sehr u. H. Tass, Z.Anal.Chem. 288, 361 (1977)
31) D.M. Hercules, Fluorescence and Phosphorescence Analysis, Wiley, New York 1966
32) C.A. Parker, Photoluminiscence : of Solutions Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New-York 1968
33) R.S. Becker, Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence, Wiley-Intersience, New York 1969
34) G.G. Guilbault, Practical Fluorescence, Marcel Dekker, New York 1973
35) H.H. Willard, L.L. Merrit u. J.A. Dean, Instrumental Methods of Analysis, D.van Nostrand Company, New York 1974
36) B.P. Graugham u. S. Walker, Spectroscopy Bd. 3 Chapman and Hall, London 1976
37) J.F. Lawrence u. R.W. Frei, J.Chromatogr. Library Vol. 7, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New-York 1976
38) Y. Kanaoka, Angew.Chem. 89, 142 (1977)
39) E.L. Wehry in (34), Kap. 3, S. 83
40) E.L. Wehry in (34), Kap. 3, S. 92
41) C.A. Parker in (32), Kap. D, S. 436

42) G. Gauglitz, persönl. Mitteilung
43) M.S. Tswett, Ber.dtsch.botan.Ges. 24, 316 (1906)
44) F. Cramer, Papierchromatographie,
Verlag Chemie, Weinheim 1958
45) E. Stahl (Hrsg.), Handbuch der Dünnschichtchromatographie 2. Auflage
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967
46) P.G. Jeffery u. P.J. Kipping, Gas Analysis by Gas Chromatography 2. Aufl., Pergamon Press,
Oxford-New York 1972
47) J.C. Giddings, Dynamics of Chromatography,
Marcel Dekker, New York 1965
48) I. Halász, A. Kroneisen, H.O. Gerlach u. P. Walking,
Z.Anl.Chem. 234, 81 (1968)
49) I. Halász, A. Kroneisen, H.O. Gerlach u. P. Walking,
Z. Anal.Chem. 234, 97 (1968)
50) L.R. Snyder u. J.J. Kirkland, Introduction to modern Liquid Chromatography, Wiley, New York 1974
51) H. Engelhardt, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1975
52) J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg u. A. Klinkenberg,
Chem.Engng.Sci. 5, 271 (1956)
53) L.R. Snyder, J.Chromatogr.Sci. 7, 352 (1969)
54) J.L. Waters, J.N. Little u. D.F. Horgan,
J.Chromatogr.Sci. 7, 293 (1969)
55) G.A. Howard u.A.J.P. Martin, Biochem.J. 46, 532 (1950)
56) D.C. Locke, J.Chromatogr. 35, 24 (1968)
57) E. Majors, Analusis 10, 549 (1975)
58) H. Colin u. G. Guiochon, J.Chromatogr. 141, 289 (1977)
59) J.J. Kirkland u. J.J. Di Stefano, J.Chromatogr.Sci. 8, 309 (1970)
60) R.E. Leitch u. J.J. Di Stefano,, J.Chromatogr.Sci. 11, 105 (1975)
61) J.J. Kirkland, J.Chromatogr.Sci. 9, 171 (1975)
62) S.R. Bakalyar, R. Mc Ilwrick u. E. Roggendorf,
J.Chromatogr. 142, 353 (1977)

63) J.B. Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, Academic Press, New York-London 1971
64) Landolt-Börnstein (Neue Serie) II/3, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967
65) G. Schetty, Helv.Chim.Acta 31, 1229 (1948)
66) M.G. Vavon, J. Bolle und J. Calin, Bull.Soc.Chim. France 6, 1025 (1939)
67) R.E. Steiger, Helv.Chim.Acta 13, 173 (1930)
68) K. Elbs u. B. Christ, J.prakt.Chem. 106, 23 (1923)
69) H.W. Thompson, J.Chem.Soc. 1932, 2310
70) R. Lesser und A. Glaser, Liebigs Ann.Chem. 402, 1 (1913)
71) N.P. Buu-Hoï und J. Lecoq, J.Chem.Soc. 1946, 830
72) R. Royer und N.P. Buu-Hoï, C.r. 222, 746 (1946)
73) B.B. Dey und K. Radhabai, J.Ind.Chem.Soc. 11, 635 (1934)
74) J.A. Secrist III, J.R. Barrio u. N.J. Leonhard, Biochem.Biophys.Res.Com. 45, 1262 (1971)
75) R.F. Borch, Anal.Chem. 47, 2437 (1975)
76) N.E. Hoffmann u. J.C. Liao. Anal.Chem. 48, 1104 (1976)
77) E.L. Johnson, Liquid Chromatography at Work 49 (1977)
78) M. Jáky, Nahrung 4, 1123 (1960)
79) J. Großfeld, Zeitschr.f.Untersuch.d.Lebensm. 62, 553 (1931)
80) J.Seibl, Massenspektrometrie, Akad.Verlagsgesellsch. Frankfurt a.M. 1970
81) Q.N. Porter u. J. Baldas, Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds, Interscience, New York 1971
82) J.A. Ballantine u. C.T. Pillinger, OMS 1, 447 (1968)
83) H. Günther, J. Prestien u. P. Joseph-Nathan, Org.Magn.Reson. 7, 339 (1975)
84) G.I. Grigor u. G.A. Webb, Org.Magn.Reson. 9, 447 (1977)
85) H. König u. E. Walldorf, Z.Anal.Chem. 276, 365 (1975)
86) R.H.F. Manske u. A.E. Ledingham, Cand.J.R. [B] 17, 14 (1939)
87) A. Spassow, Chem.Ber. 75, 779 (1942)

88) V.R. Olson u. H.B. Feldmann, J.Amer.Soc. 59, 2003 (1937)
89) A. Schönberg u. A. Mustafa, Soc. 1948, 605
90) G.M. Badger, W. Carruthers u. J.W. Cook,
J.Chem.Soc. 1949, 1768
91) H. Meerwein in Houben-Weyl Bd. VI/3, S. 62,
Georg Thieme, Stuttgart 1965
92) G.A.R. Kon u. F.C.J. Ruzicka, Soc. 1936, 187
93) D. Balcom u. A. Furst, J.Amer.Soc. 75, 4334 (1953)
94) H. Glaser in Houben-Weyl Bd. XI/1, S. 209,
Georg Thieme, Stuttgart 1965
95) W. Baker, C.N. Haksar u. J.F.W. McOmie,
J.Chem.Soc. 1950, 170
96) R.M. Cassidy, D.S. Le Gay u. R.W. Frei,
Anal.Chem. 46, 340 (1974)
97) W. Strubert, Chromatographia 6, 50 (1973)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, R. Hamm, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. König, W. Kraus, H. Krüger, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, H. Meier, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, H. Schott, W. Schweizer, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Straub, E. Stumpp, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

16. Sept. 1948	in Plüderhausen (Rems-Murr-Kreis) geboren Eltern: Dr. med. Werner Meyer Dorothee Meyer geb. Freiin vom Holtz
1956-1960	Besuch der Grundschule in Plüderhausen
April 1960	Wechsel auf das Gymnasium Schorndorf
Mai 1968	Reifeprüfung am Gymnasium Schorndorf
WS 1968/69	Immatrikulation für Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Sept. 1971	Abschluß des Vordiploms
Okt./Nov.1974	Mündliche Diplomprüfung
Dez. 1974 - Mai 1975	Diplomarbeit "Massenspektrometrische Untersuchungen an dansylierten Peptid-Methylestern"
Juni 1975 - Mai 1978	Praktischer Teil der Doktorarbeit
20. April 1974	Eheschließung mit Annemarie geb. Beck-Wörner

Dissertationsdruck
GmbH & Co. KG.
86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str.9b · Tel. 0951/5 44 14

M. SCHADEL